

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
15. Februar 2001 (15.02.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/11370 A1**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **G01N 33/58**, (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, 33/533, C09B 23/14, 23/01 AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP00/07070**
- (22) Internationales Anmeldedatum: 24. Juli 2000 (24.07.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 199 37 024.9 5. August 1999 (05.08.1999) DE
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): **BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]**; D-51368 Leverkusen (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): **DEROOVER, Geert** [BE/BE]; Ogezaan 26, B-2500 Lier (BE). **MISSFELDT, Michael** [DE/DE]; Schnugsheide 27, D-42799 Leichlingen (DE). **SIMON, Lydia** [DE/DE]; Zeisigweg 10, D-42489 Wülfrath (DE).
- (74) Gemeinsamer Vertreter: **BAYER AKTIENGESELLSCHAFT**; D-51368 Leverkusen (DE).

- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

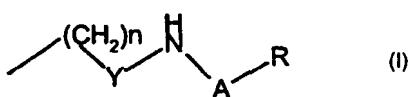
- Mit internationalem Recherchenbericht.
- Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: USE OF ACYLSULFONAMIDO-SUBSTITUTED POLYMETHINE DYES AS FLUORESCENCE DYES AND/OR MARKERS

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON ACYLSULFONAMIDO SUBSTITUIERTEN POLYMETHIN-FARBSTOFFEN ALS FLUORESENZ-FARBSTOFFE UND/ODER MARKER

**WO 01/11370 A1**



(57) Abstract: The invention relates to novel polymethine dyes that contain at least one acylsulfonamido group according to formula (I) wherein n, Y, A and R have the meaning indicated in the claims, and at least one compound according to formulae (a) to (n) indicated in the claims. The inventive polymethine dyes are useful as dyes and/or markers, especially for staining or marking biomolecules.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft neue Polymethinfarbstoffe enthaltend mindestens eine Acylsulfonamidogruppe gemäß Formel (I), worin n, Y, A und R die in den Ansprüchen angegebene Bedeutung haben, sowie mindestens eine Verbindung der in den Ansprüchen angegebenen Formeln (a) bis (n). Die erfindungsgemäßen Polymethinfarbstoffe eignen sich zur Verwendung als Farbstoffe und/oder Marker, insbesondere zum Anfärben oder Markieren von Biomolekülen.

**Verwendung von Acylsulfonamido substituierten Polymethin-Farbstoffen als Fluoreszenz-Farbstoffe und/ oder Marker**

5 In den letzten Jahren wurden immer empfindlichere und einfacher zu handhabende Detektionsmethoden entwickelt, die besonders in der Biotechnologie, wo geringe Substanzmengen für eine Analyse zur Verfügung stehen, eingesetzt werden. Hier finden beispielsweise fluoreszente Detektionsmethoden immer weitere Verbreitung. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden als Label benutzt, um biologische Substanzen, wie  
10 Proteine, DNA, RNA, Kohlenhydrate, Fette oder ganze Zellen zu markieren. Da jedoch viele der zu markierenden Substanzen selbst fluoreszente Eigenschaften im Bereich um 400 bis 500 nm aufweisen sollten die zur Markierung einzusetzenden Farbstoffe bei Wellenlängen oberhalb 500 nm, üblicherweise im Bereich zwischen 500 und 1200 nm, absorbieren. In diesem Wellenlängenbereich sind außerdem preiswerte  
15 Laser Dioden als Lichtquellen verfügbar.

Die aus dem Stand der Technik bekannten Fluoreszenzfarbstoffe sind häufig mit hydrophilen oder aciden Gruppen substituiert, um die Wasserlöslichkeit bei neutralem oder leicht basischem pH zu gewährleisten. Dies erleichtert die Markierung  
20 von biologischem Material, das überwiegend im wässrigen Medium funktionsfähig ist. Die Farbstoffe sollten außerdem photostabil sein, um auch Messmethoden, die eine längere Bestrahlung beinhalten, zu ermöglichen. Viele der längerwelligen Farbstoffe weisen jedoch keine ausreichende Photostabilität auf.

25 Die Farbstoffe werden kovalent oder auch adsorptiv an die biologischen Proben gebunden. Proteine, z.B. weisen mit der Sulfhydrylgruppe und freien Aminogruppen reaktive Reste auf, an die ein Farbstoffmolekül kovalent gekoppelt werden kann. Des weiteren können sich hydrophile oder lipophile Farbstoffe adsorptiv an die hydrophilen und hydrophoben Domänen der Proteine anlagern. Ebenso können über  
30 ionische Wechselwirkungen Adsorptionen von ionischen Farbstoffen an Proteine stattfinden.

- Die bisher häufig in Bioassays eingesetzten Cyaninfarbstoffe (Waggoner et al. Bioconjugate Chemistry, 4,105-111,(1993), US 5,268,486, WO 97/13810) haben die Eigenschaft zu aggregieren. Es können sich neben dem Monomer noch H-Aggregate und J-Aggregate ausbilden, je nach chemischer Umgebung, (z.B. pH-Wert) des Farbstoffes. Dies wird in der Photographie ausgenutzt, da die Absorptionen der Aggregate hypsochrom bzw. bathochrom gegenüber der Monomerabsorption verschoben sind. Dieser Aggregationseffekt ist für das Biolabeling jedoch unerwünscht, weil er auch hier zu einer oder mehreren zusätzlichen Absorptionsbanden führt.
- Häufig werden Multiplexassays durchgeführt, bei denen mit verschiedenen Farbstoffen markierte Proben bei verschiedenen Wellenlängen angeregt werden. Um eine ausreichende Trennung der Anregungs- und Emissionssignale zu erhalten, dürfen die Absorptionen der Farbstoffkonjugate nicht überlappen. Hier ist eine scharfe, reproduzierbare und von pH-Wert oder Lösungsmitteleinflüssen unabhängige Absorption der Farbstoffe wichtig. Die Aggregationsneigung der häufig verwendeten Cyaninfarbstoffe verringert außerdem die Intensität der Fluoreszenz durch Quenching. Die emittierte Strahlung wird entweder direkt wieder reabsorbiert oder es kommt zu strahlunglosen Verlustprozessen der Energie.
- Die aus dem Stand der Technik bekannten Farbstoffe zum Biolabeln, die Cyaninfarbstoffe stellen eine Klasse der Polymethine dar. Daneben sind aus der WO 97/40104 beispielsweise Quadratsäurederivate als Farbstoffe für das Biolabeling bekannt.
- Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, neue Fluoreszenzfarbstoffe als Fluoreszenzlabel oder Färbungsfarbstoffe mit verbesserten Eigenschaften gegenüber den aus dem Stand der Technik bekannten Cyaninfarbstoffen zur Verfügung zu stellen. Insbesondere sollte die Löslichkeit in biologischen Puffersystemen sowie die Photostabilität verbessert werden und besonders die Aggregationsneigung verringert werden. Gleichzeitig sollten die erfindungsgemäßen Verbindungen sich jedoch auch

- 3 -

durch eine höhere Quantenausbeute sowie einen höheren Extinktionskoeffizienten auszeichnen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Polymethinfarbstoffe enthaltend  
5 mindestens eine Acylsulfonamidogruppe gemäß Formel (I)



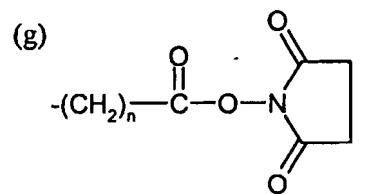
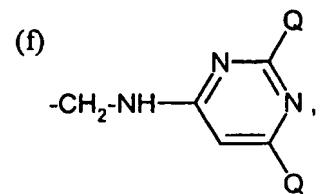
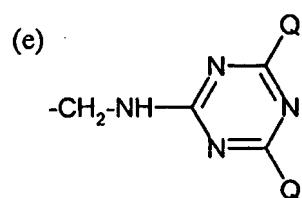
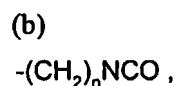
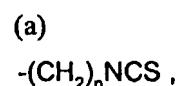
worin

10 n für 1,2,3, 4, 5, 6, 7, 8 oder 9

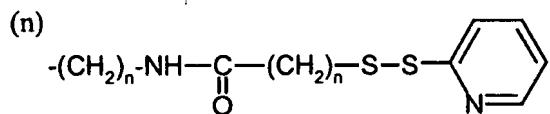
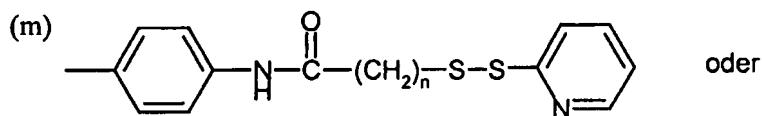
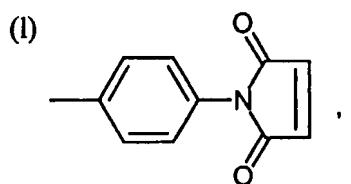
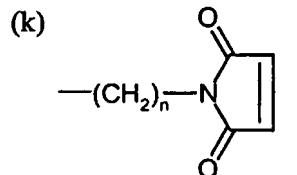
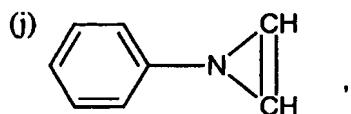
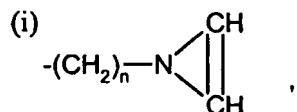
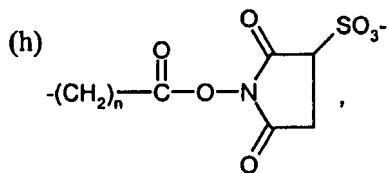
Y, A für elektronenziehende Reste, vorzugsweise C=O oder -SO<sub>2</sub>-, und

R für einen gegebenenfalls substituierten Alkyl- oder Arylrest

15 stehen und enthaltend mindestens eine Verbindung der folgenden Formeln:

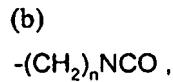
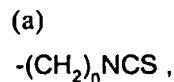


- 4 -

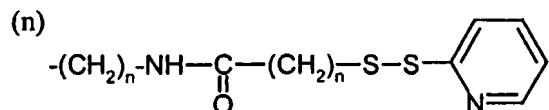
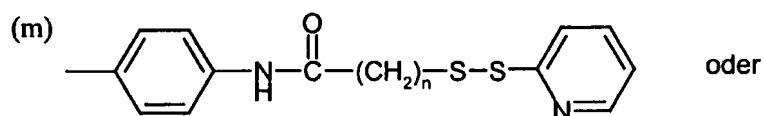
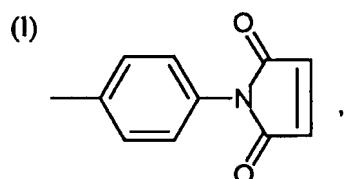
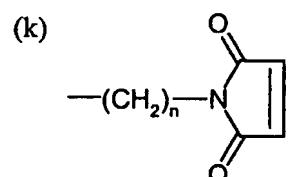
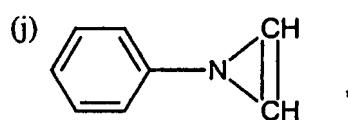
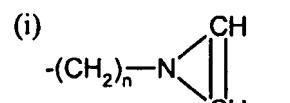
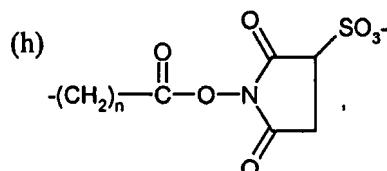
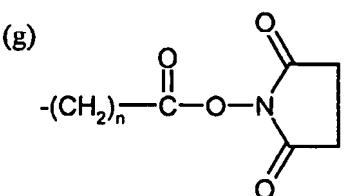
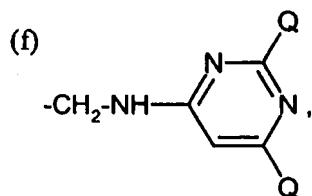
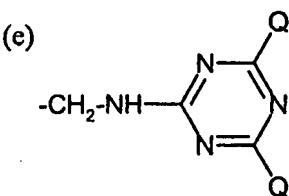
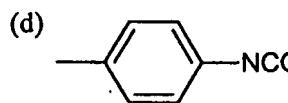


Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von Polymethinfarbstoffen enthaltend mindestens eine Acylsulfonamidogruppe gemäß Formel (I) zum Anfärben und/ oder Biolabeln von Biomolekülen.

- 5 Erfindungsgemäße Polymethinfarbstoffe, die nicht nur zum Anfärben sondern zum Biolabeln durch Ausbildung einer kovalenten Bindung verwendet werden sollen, weisen neben einer Gruppe der Formel (I) zusätzlich mindestens eine Gruppe auf, die in der Lage ist eine solche kovalente Bindung auszubilden, derartige Gruppen sind erfindungsgemäß vorzugsweise

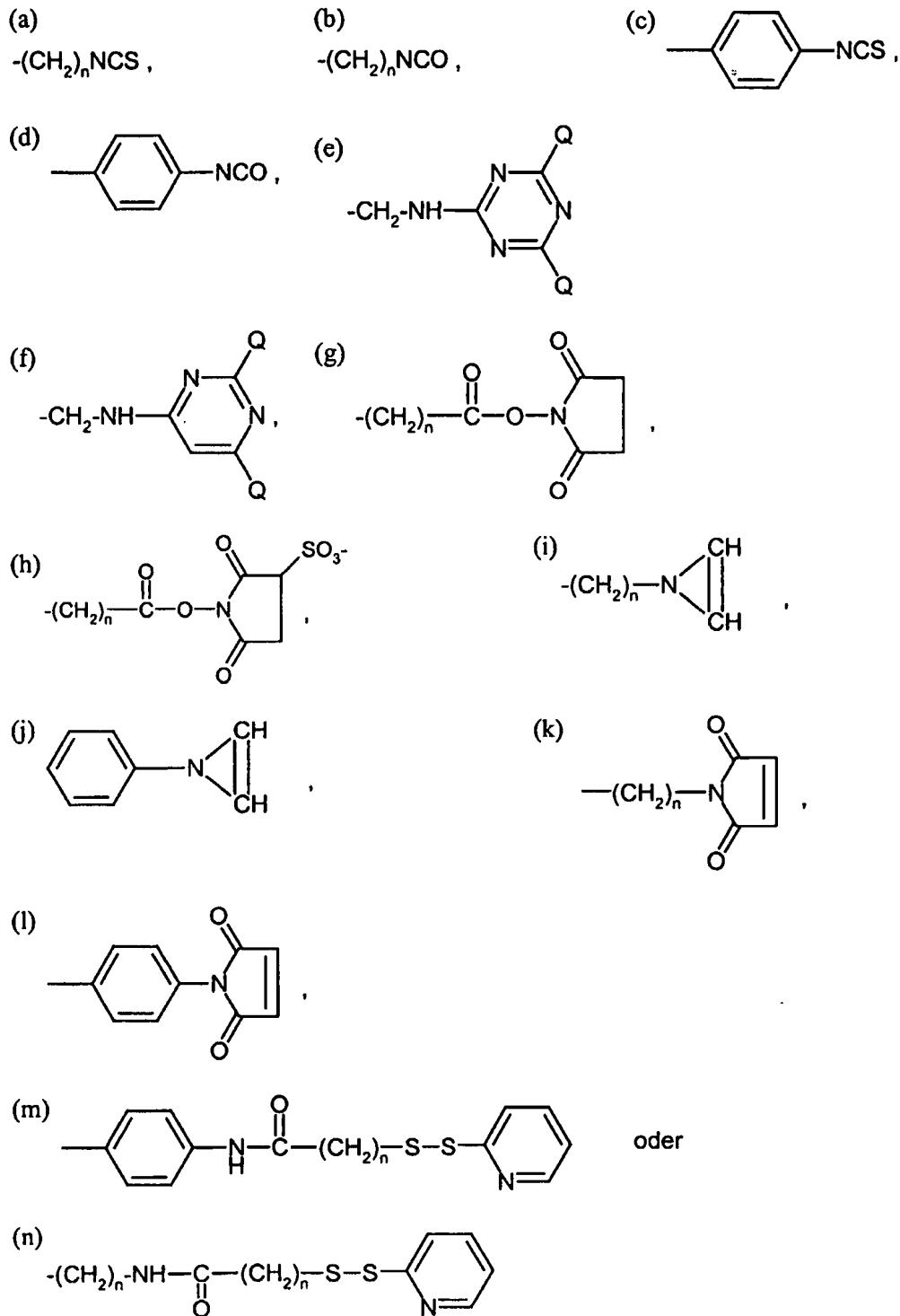


- 5 -



Daher betrifft ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung die Verwendung von Polymethinfarbstoffen enthaltend mindestens eine Acylsulfonamidogruppe gemäß Formel (I) und mindestens eine zur kovalenten Bindung befähigte Gruppierung ausgewählt aus der Liste der folgenden Verbindungen:

- 6 -



zum Markieren von Biomolekülen durch kovalente Bindung.

Unter **Biomolekülen** sind im Sinne der folgenden Anmeldung Proteine sowie DNA und/ oder RNA zu verstehen. Außerdem können im Sinne der vorliegenden Anmeldung auch Zellen als Biomoleküle angesehen werden. Ebenso sind darunter auch kleine organische Moleküle mit biologischer Wirkung zu verstehen.

Polymethinfarbstoffe, die neben einer Verbindung der Formel (I) zusätzlich eine Gruppe ausgewählt aus einer der Formeln (a) bis (n) aufweisen sind aus dem Stand der Technik noch nicht bekannt und stellen neue Verbindungen dar. Diese eignen sich insbesondere zum Biolabeln, da sie befähigt sind kovalente Bindungen auszubilden.

Unter einer **elektronenziehenden Gruppe** im Sinne der vorliegenden Anmeldung sind sofern nicht anders beschrieben bevorzugt Gruppen zu verstehen, wie sie in March, Advanced Organic Chemistry, 3rd Ed., S.17 und S. 238 beschrieben sind.

Unter **Alkyl** im Sinne der vorliegenden Anmeldung sind sofern nicht anders definiert lineare oder verzweigte, cyclische oder geradkettige, substituierte oder nicht substituierte Kohlenwasserstoffe zu verstehen. Insbesondere handelt es sich dabei um Alkylgruppen mit 1 bis 12 C-Atomen, wie beispielsweise Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Isopropyl-, Butyl-, t-Butyl-, Neopentyl- und 2-Ethylhexylgruppen. Diese können jedoch weiter substituiert sein, besonders bevorzugt mit einer Carboxycarbonylgruppe.

Unter **Aryl** im Sinne der vorliegenden Anmeldung sind sofern nicht anders definiert aromatische Kohlenwasserstoffgruppen zu verstehen, wobei es sich vorzugsweise um 5- oder 6-gliedrige Ringsysteme handelt, welche monocyclisch aber auch als kondensierte Ringsysteme vorliegen können. Es kann sich dabei sowohl um substituierte als auch um nicht substituierte Ringsysteme handeln. Besonders bevorzugt sind beispielsweise Phenyl- und Naphthylgruppen.

- 8 -

Es wurde überraschenderweise gefunden, dass bei Verwendung der erfindungsgemäßen Farbstoffe in biologischen Systemen, wie z.B. in Proteinkonjugaten oder in biologischen Puffermedien, die Aggregationsneigung der Polymethine im Vergleich zu Cyaninen oder Quadratsäurefarbstoffen mit Alkylsulfonaten oder Alkylcarboxylaten wie sie in Patenten US 5,268,486, WO 96/00902, WO 97/13810 und WO 5 97/40104 beschrieben sind, deutlich reduziert werden konnte.

Ein weiterer Vorteil der erfindungsgemäß zu verwendenden Farbstoffe liegt darin, dass durch den Substituenten die chromogenen Eigenschaften der Polymethine nicht verändert werden. Bisher wurden z.B. die Funktionalität für eine verbesserte Löslichkeit der Cyaninfarbstoffe durch Einführen von Sulfogruppen in das am Chromophor beteiligte Arylsystem realisiert. Dies hat auch eine Verschiebung der spektralen Eigenschaften zufolge, da die Substituenten elektronenziehende Wirkungen hatten. Die spektralen Eigenschaften von unsubstituierten Arylcyaninen sind beschrieben und so kann man durch die Einführung des Acylsulfonsäurerestes das Farbstoffsystem für den Einsatz in z.B. einem Bioassay direkt übertragen. Dies erspart langwierige Optimierungs- und Screeningarbeit.

Weiterhin weisen die Farbstoffe mit Acylsulfonamidgruppen einen hohen Extinktionskoeffizienten im Vergleich zu Alkylcarboxylaten auf. Dies führt zu einem weiteren Vorteil in der Anwendung als Label:

Bindet man die Farbstoffe kovalent als Label an z.B. ein Protein oder einen Antikörper, dann wird das Konjugat durch das molare Farbstoff/Proteingehaltsverhältnis charakterisiert. Um ein ausreichendes Signal zu erhalten, muss eine bestimmte Menge Farbstoff an das Protein gebunden sein. Je höher der Extinktionskoeffizient des Farbstoffs ist und damit seine Intensität, um so sensitiver ist der Farbstoff als Fluoreszenzlabel, da die Fluoreszenzintensität bei Absorptionen <0.05 vom Extinktionskoeffizient abhängig ist.

30

$$F = \phi K I_0 \epsilon cd$$

- 9 -

$\Phi$  = Quantenausbeute

$I_0$  = Intensität des eingestrahlten Lichtes

$\epsilon$  = Extinktionskoeffizient

5

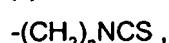
c = Konzentration der Probe

d = Schichtdicke

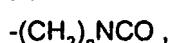
Da sich die Farbstoffe jedoch bei räumlicher Nähe quenchen, sollte das Farbstoff/Proteinverhältnis nicht zu groß werden. Dies hat einen Verlust der Fluoreszenzintensität zufolge. Daher sind Farbstoffe mit hohen Extinktionskoeffizienten besonders geeignet als Fluoreszenzlabel. Bereits geringe Farbstoffmengen ergeben ein intensives Fluoreszenzsignal bei einem geringen molaren Farbstoff/Proteingehaltsverhältnis. Quenchprozesse werden also minimiert.

15     Als erfindungsgemäß einzusetzende Polymethinfarbstoffe eignen sich insbesondere Cyaninfarbstoffe, Merocyanine, Rhodacyanine, Styrolfarbstoffe, Quadratsäurefarbstoffe und der Crotonsäurefarbstoffe, wie sie im folgenden in bevorzugten Ausführungsformen näher beschrieben sind, welche sich alle dadurch auszeichnen, dass sie zur erfindungsgemäßen Verwendung mindestens einen Substituenten gemäß der  
20     Formel (I) aufweisen. In einer weiteren Ausführungsform können auch die Polymethinfarbstoffe der Formeln (1) bis (5) aneinander gebunden sein, dabei können sowohl zwei oder mehr gleiche als auch verschiedene Farbstoffe aneinander gebunden sein. Erfindungsgemäße Polymethinfarbstoffe sind vorzugsweise solche der im folgenden aufgeführten Formeln welche neben einem Substituenten der Formel (I)  
25     zusätzlich mindestens einen Substituenten ausgewählt aus der Gruppe der folgenden Verbindungen enthalten:

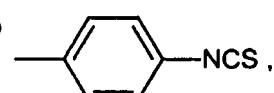
(a)



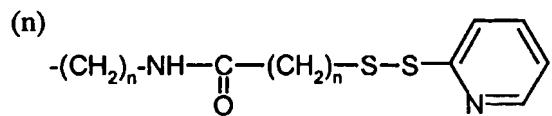
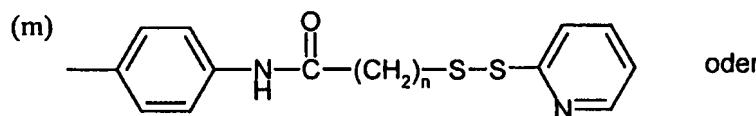
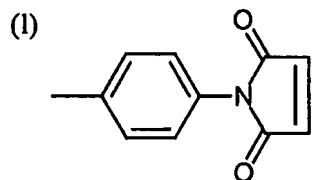
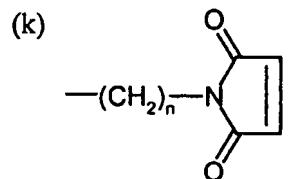
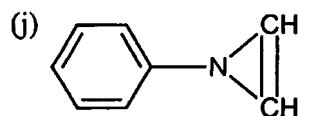
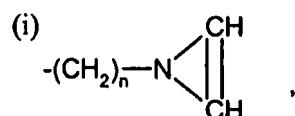
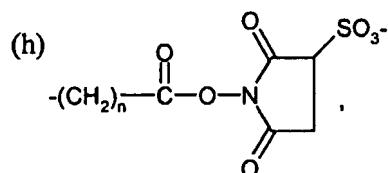
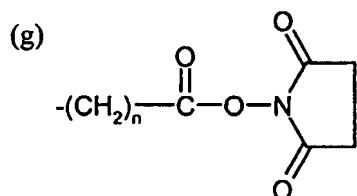
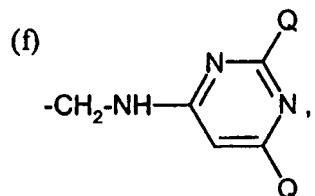
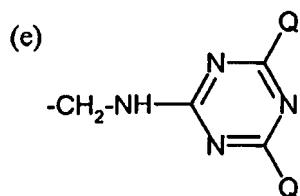
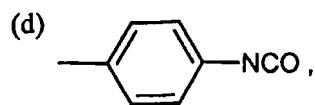
(b)



(c)

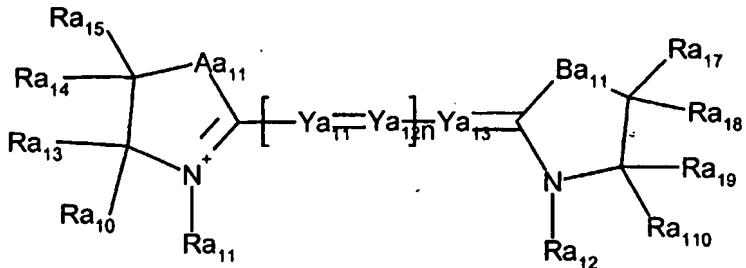


- 10 -

**1. Cyaninfarbstoffe:**

Als Cyaninfarbstoffe kommen erfundungsgemäß insbesondere solche der Formeln 1a, 1b und/ oder 1c in Frage

- 11 -



Formel 1-a

in der

5

Ra<sub>10</sub> bis Ra<sub>110</sub> unabhängig voneinander für einen beliebigen Substituenten stehen können,

n für 0,1,2,3 oder 4 steht,

10

Ya<sub>11</sub>, Ya<sub>12</sub> und Ya<sub>13</sub> unabhängig voneinander für substituiertes oder unsubstituiertes C oder N stehen können wobei die Substituenten auch einen 5- oder 6-gliedrigen, aliphatischen oder aromatischen Carbo- oder Heterocyclus bilden können,

15

und

Aa<sub>11</sub> und Ba<sub>11</sub> unabhängig voneinander für O, S, Se, Te, N-Ra<sub>111</sub>, C(Ra<sub>112</sub>)(Ra<sub>113</sub>) oder -C(Ra<sub>114</sub>)=C(Ra<sub>115</sub>)-, wobei Ra<sub>11</sub> bis Ra<sub>115</sub> unabhängig voneinander für H, gegebenenfalls substituiertes Alkyl, gegebenenfalls substituiertes Aryl oder gegebenenfalls substituiertes Alkenyl mit bis zu 20 C-Atomen stehen können,

mit der Maßgabe, dass mindestens einer der Substituenten Ra<sub>10</sub> bis Ra<sub>115</sub> ausgewählt ist aus der Gruppe, die gebildet wird durch -(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-SO<sub>2</sub>-Z-SO<sub>2</sub>-R, -(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-CO-Z-SO<sub>2</sub>-R, -(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-SO<sub>2</sub>-Z-CO-R, und-(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-N(R)-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>,

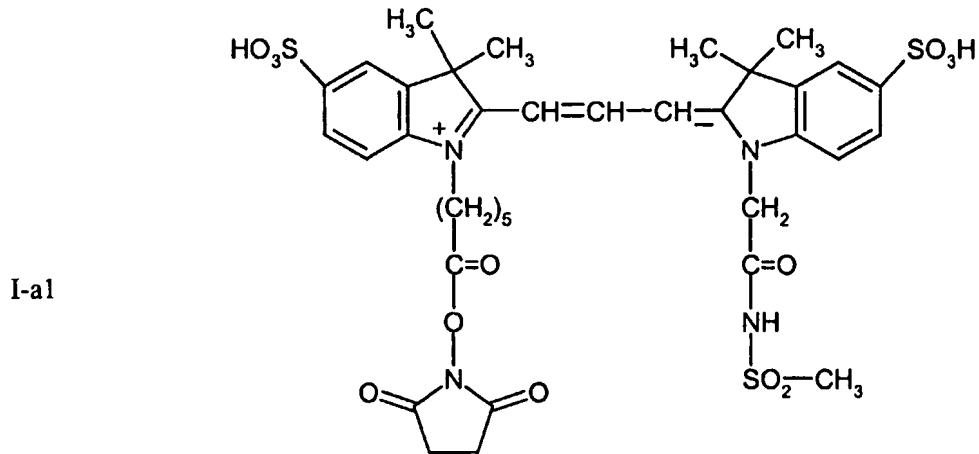
- 12 -

wobei

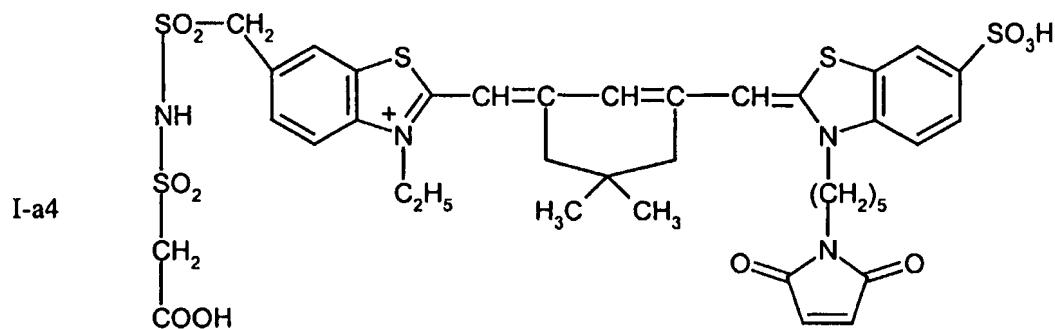
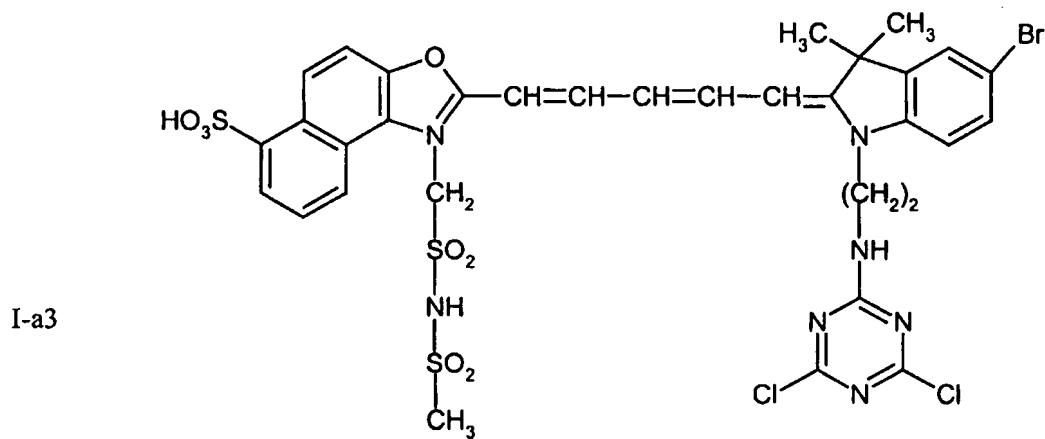
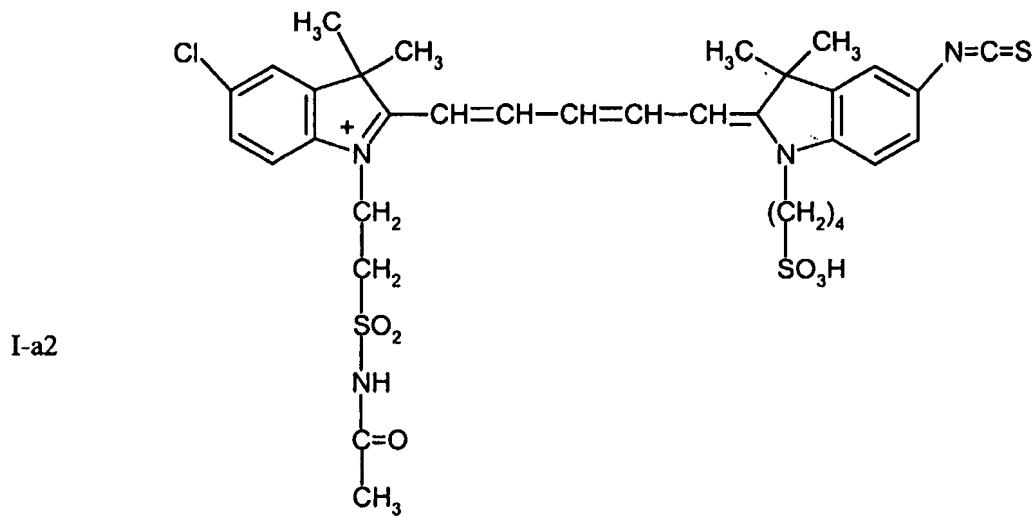
- 1 für eine Zahl zwischen 1 und 6,
- 5 Z für NH oder N<sup>+</sup> steht und
- R bevorzugt für gegebenenfalls substituiertes Alkyl oder Aryl steht.

Besonders bevorzugte erfindungsgemäß einzusetzende Verbindungen der Formel 1a  
10 sind im folgenden aufgeführt

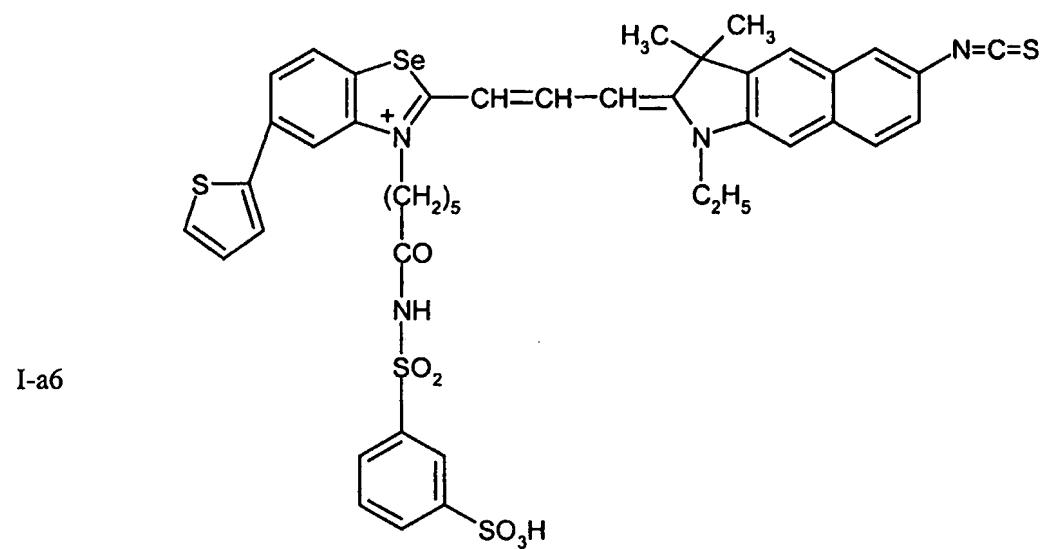
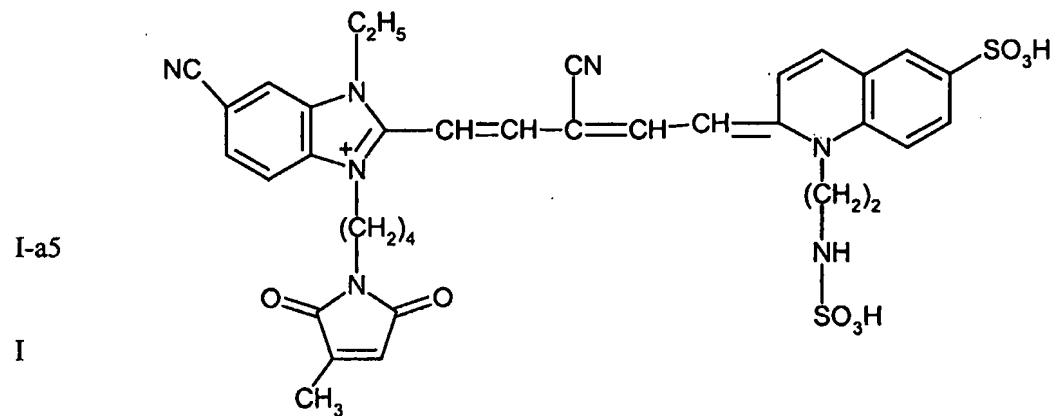
**Bevorzugte Verbindungen der Formel 1a**



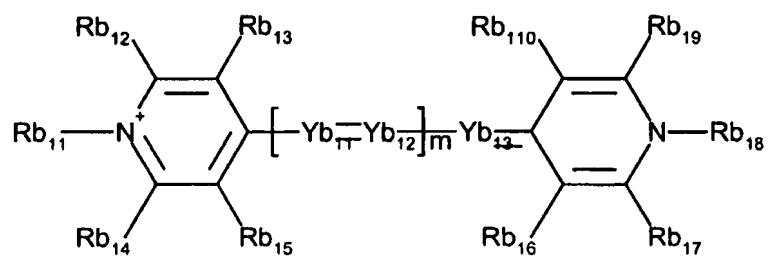
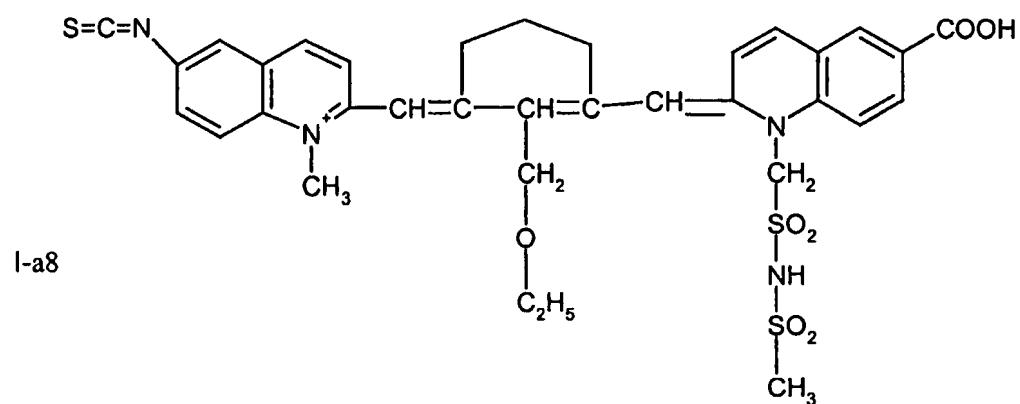
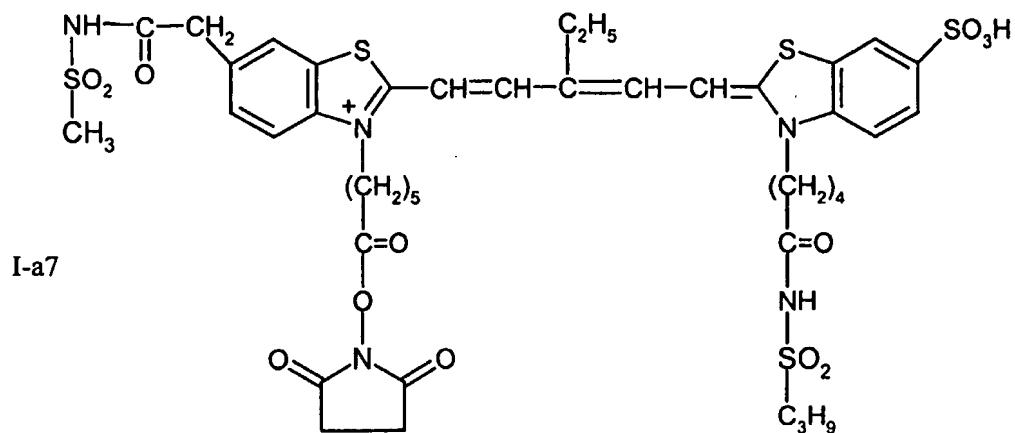
- 13 -



- 14 -



- 15 -



### Formel 1-b

- 16 -

in der

Rb<sub>10</sub> bis Rb<sub>110</sub> unabhängig voneinander für einen beliebigen Substituenten stehen können,

5

m für 0,1,2,3 oder 4 steht und

Yb<sub>11</sub>, Yb<sub>12</sub> und Yb<sub>13</sub> unabhängig voneinander für substituiertes oder unsubstituiertes C oder N stehen können wobei die Substituenten auch einen 5- oder  
10 6-gliedrigen, aliphatischen oder aromatischen Carbo- oder Heterocyclus bilden können,

15 mit der Maßgabe, dass mindestens einer der Substituenten Rb<sub>11</sub> bis Rb<sub>110</sub> ausgewählt ist aus der Gruppe, die gebildet wird durch -(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-SO<sub>2</sub>-Z-SO<sub>2</sub>-R,  
- (CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-CO-Z-SO<sub>2</sub>-R, -(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-SO<sub>2</sub>-Z-CO-R, und-(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-N(R)-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>,

wobei

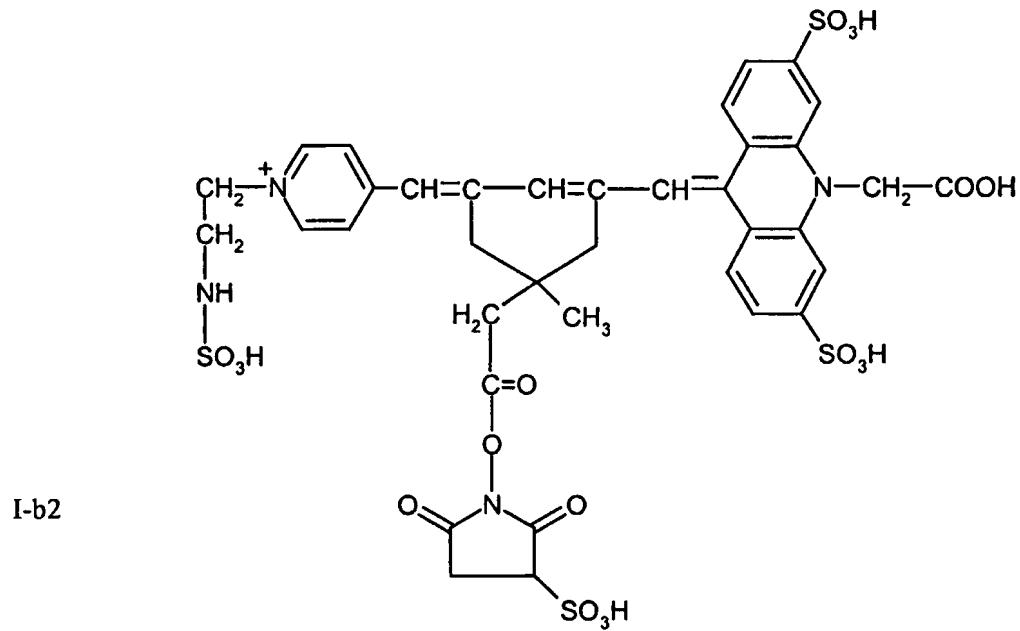
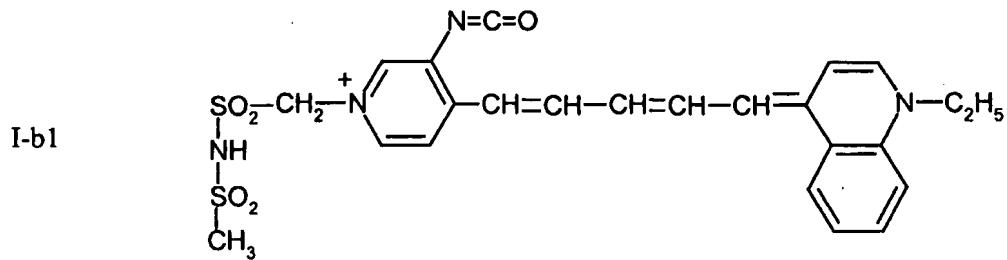
1 20 l für eine Zahl zwischen 1 und 6,  
Z für NH oder N<sup>-</sup> steht und  
R bevorzugt für gegebenenfalls substituiertes Alkyl oder Aryl steht.  
25 In einer bevorzugten Ausführungsform bilden folgende Substituenten einen 5-oder 6gliedrigen Carbo- oder Heterocyclus, der gegebenenfalls auch annelliert ist:

30 Der Substituent Rb<sub>11</sub> zusammen mit Rb<sub>12</sub> und/oder Rb<sub>14</sub>, der Substituent Rb<sub>12</sub> zusammen mit Rb<sub>13</sub> und/oder Rb<sub>11</sub>, der Substituent Rb<sub>14</sub> zusammen mit Rb<sub>15</sub> und/oder Rb<sub>11</sub>, der Substituent Rb<sub>18</sub> zusammen mit Rb<sub>19</sub> und/oder Rb<sub>17</sub>, der Substituent Rb<sub>17</sub>

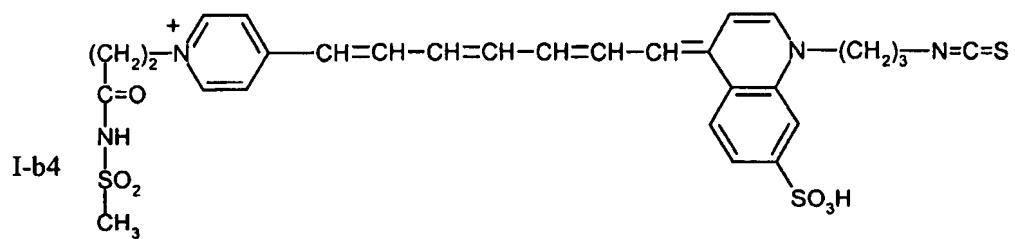
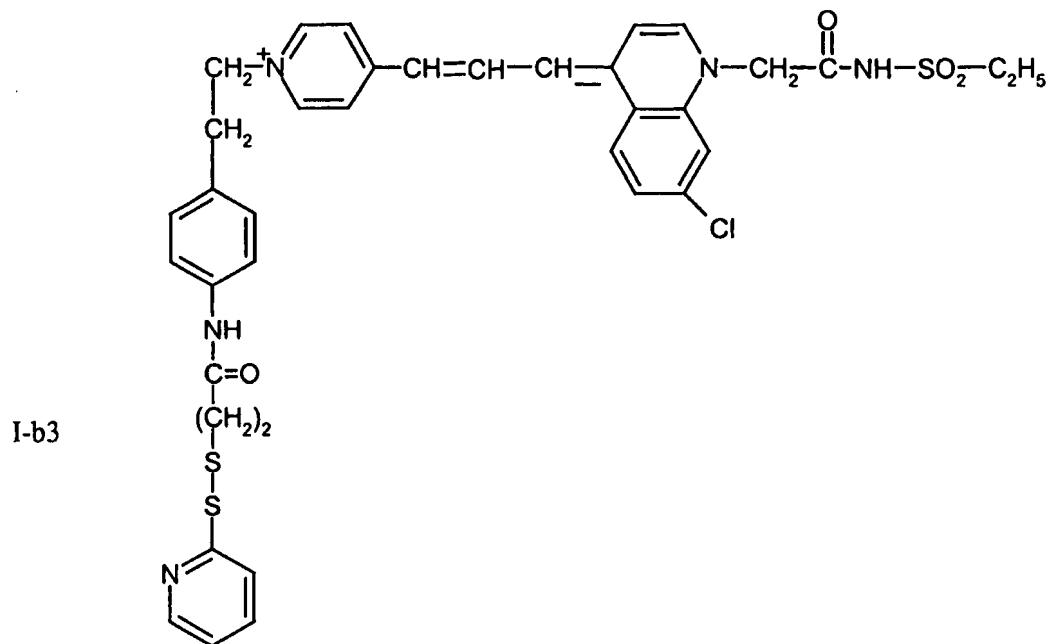
- 17 -

zusammen mit Rb<sub>16</sub> und/oder Rb<sub>18</sub>, der Substituent Rb<sub>19</sub> zusammen mit Rb<sub>110</sub> und/oder Rb<sub>18</sub>.

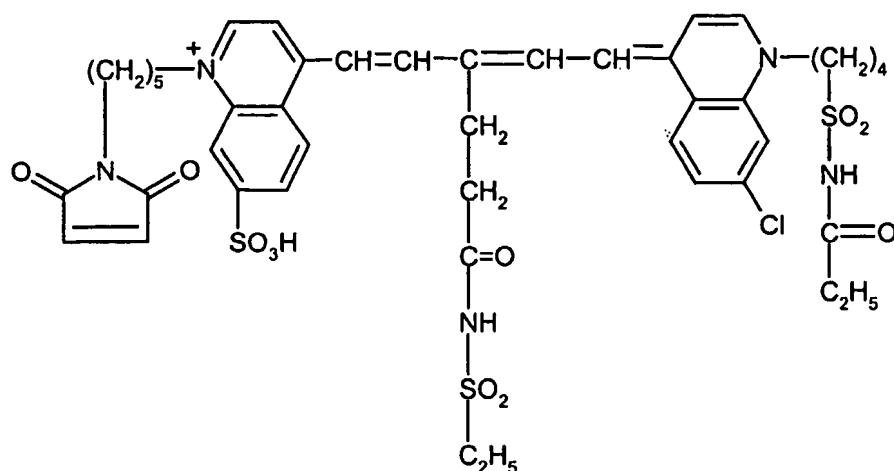
**Besonders bevorzugte Verbindungen der Formel 1b:**



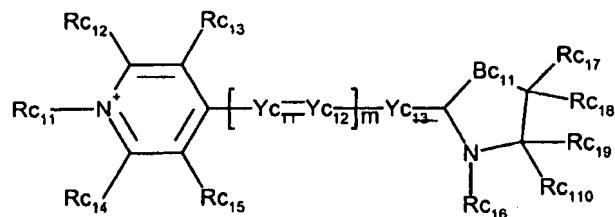
- 18 -



- 19 -



I-b5



Formel 1-c

5

in der

Rc<sub>11</sub> bis Rc<sub>110</sub> unabhängig voneinander für einen beliebigen Substituenten stehen können,

10

m für 0,1,2,3 oder 4 steht,

15 Yc<sub>11</sub>, Yc<sub>12</sub> und Yc<sub>13</sub> unabhängig voneinander für substituiertes oder unsubstituiertes C oder N stehen können wobei die Substituenten auch einen 5- oder 6-gliedrigen, aliphatischen oder aromatischen Carbo- oder Heterocyclus bilden können,

- 20 -

und

Bc<sub>11</sub> für O, S, Se, Te, N-Rc<sub>111</sub>, C(Rc<sub>112</sub>)(Rc<sub>113</sub>) oder -C(Rc<sub>114</sub>)=C(Rc<sub>115</sub>)-, wobei  
5 Rc<sub>11</sub> bis Rc<sub>115</sub> unabhängig voneinander für H, gegebenenfalls substituiertes  
Alkyl, gegebenenfalls substituiertes Aryl oder gegebenenfalls substituiertes  
Alkenyl mit bis zu 20 C-Atomen stehen können,  
mit der Maßgabe, dass mindestens einer der Substituenten Rc<sub>10</sub> bis Rc<sub>115</sub>  
ausgewählt ist aus der Gruppe, die gebildet wird durch -(CH<sub>2</sub>)<sub>1</sub>-SO<sub>2</sub>-Z-SO<sub>2</sub>-R,  
-(CH<sub>2</sub>)<sub>1</sub>-CO-Z-SO<sub>2</sub>-R, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1</sub>-SO<sub>2</sub>-Z-CO-R, und-(CH<sub>2</sub>)<sub>1</sub>-N(R)-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>,

10

wobei

1        für eine Zahl zwischen 1 und 6,

15      Z        für NH oder N<sup>-</sup> steht und

R        bevorzugt für gegebenenfalls substituiertes Alkyl oder Aryl steht.

In einer bevorzugten Ausführungsform bilden folgende Substituenten einen 5-oder  
20 6gliedrigen Carbo- oder Heterocyclus der gegebenenfalls auch annelliert ist:

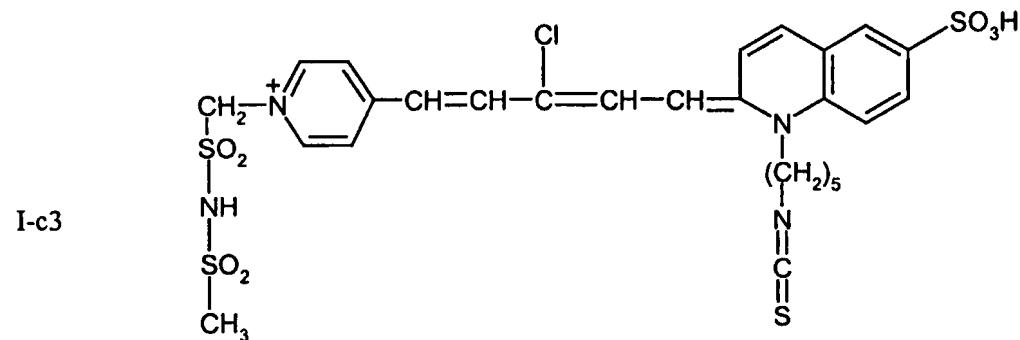
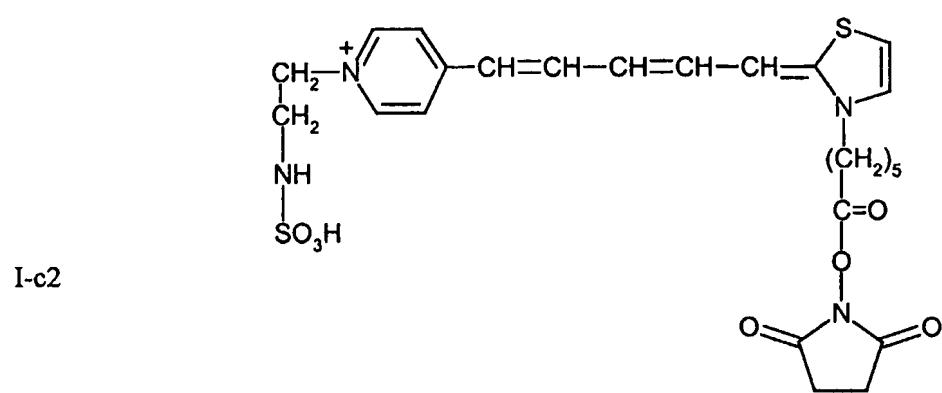
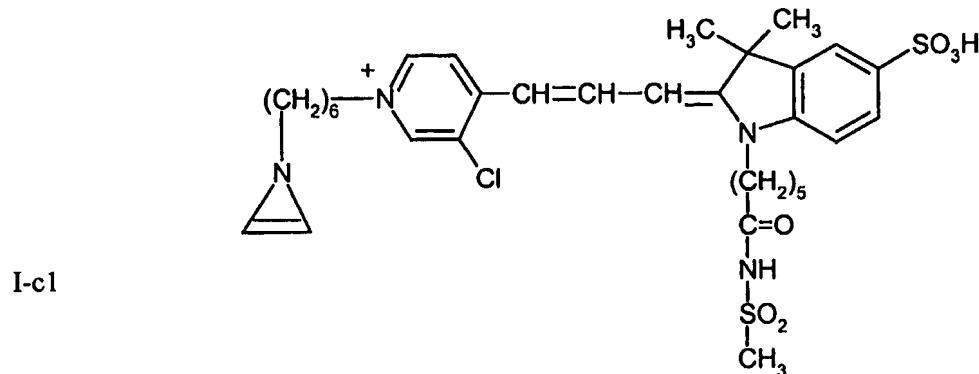
Der Substituent Rc<sub>11</sub> zusammen mit Rc<sub>12</sub> und/oder Rc<sub>14</sub>, der Substituent Rc<sub>12</sub> zu-  
sammen mit Rc<sub>13</sub> und/oder Rc<sub>11</sub>, der Substituent Rc<sub>14</sub> zusammen mit Rc<sub>15</sub> und/oder  
Rc<sub>11</sub>.

25

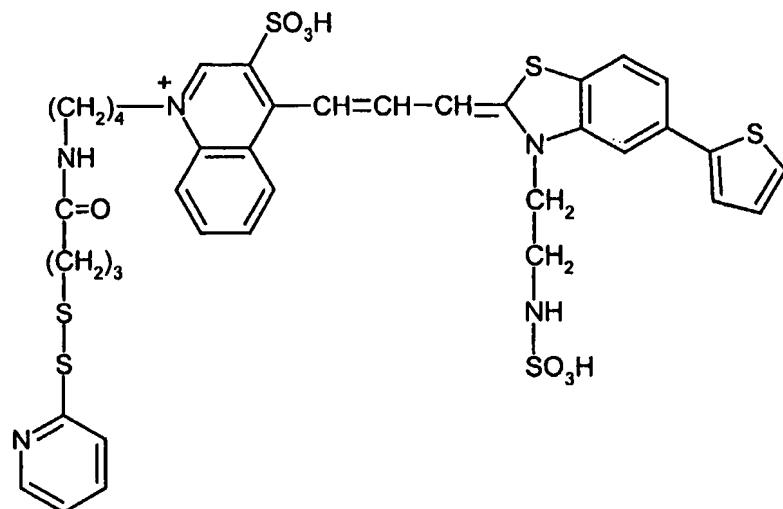
Vorzugsweise können die Substituenten Rc<sub>17</sub> bis Rc<sub>110</sub> die restlichen Glieder eines  
carbo-bzw. heterocyclischen Ringsystems bilden, das bis zu 4 Ringen enthalten kann,  
die gegebenenfalls mehrere Substituenten tragen können. Rc<sub>18</sub> kann zusammen mit  
Rc<sub>19</sub> eine π-Bindung bilden und Rc<sub>17</sub> und Rc<sub>110</sub> können Substituenten darstellen.

30

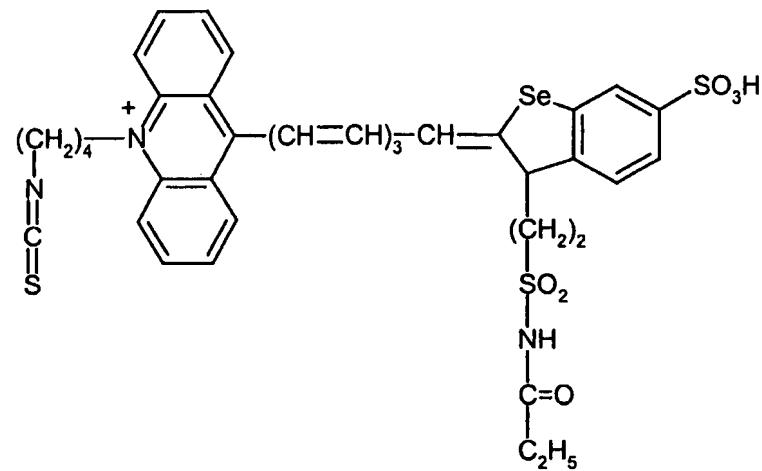
- 21 -

**Besonders bevorzugte Verbindungen der Formel 1c:**

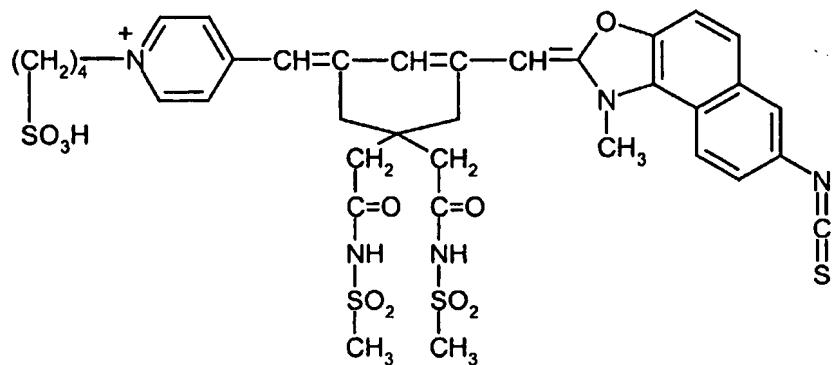
- 22 -



I-c4



I-c5



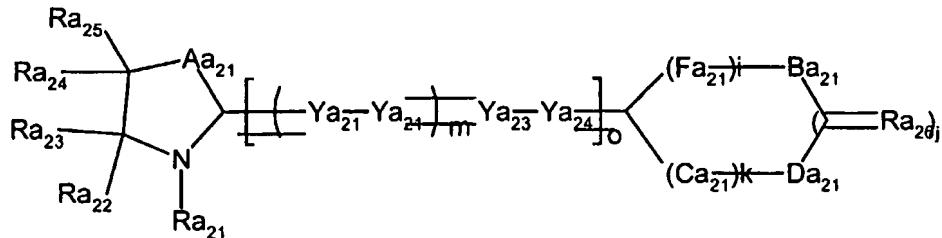
I-c6

- 23 -

## 2. Merocyanine

Im Sinne der vorliegenden Erfindung eignen sich insbesondere Merocyanine gemäß der Formeln 2a und/ oder 2b

5



Formel 2a

in der

10 Ra<sub>21</sub> bis Ra<sub>25</sub> unabhängig voneinander für einen beliebigen Substituenten stehen,

Y<sub>21</sub>, Y<sub>22</sub>, Y<sub>23</sub>, Y<sub>24</sub> unabhängig voneinander für substituiertes oder unsubstituiertes C oder N stehen, wobei die Substituenten auch einen 5-oder 6gliedrigen, aliphatischen oder aromatischen Carbo-oder Heterocyclus bilden können.

15

m für 0,1,2,3,4

o für 0,1,2

20

Fa<sub>21</sub> und Ca<sub>21</sub> unabhängig voneinander für C=O, C=S oder C(Ra<sub>27</sub>)=,

Ba<sub>21</sub> und Da<sub>21</sub> unabhängig voneinander für gegebenenfalls substituiertes C, N, O oder S steht,

25

Ra<sub>26</sub> für O, S, oder einen weiteren heterocyclischen, gegebenenfalls substituierten 5-oder 6-gliedrigen Ring steht

k,i,und j unabhängig voneinander für 0 oder 1 stehen

Ra<sub>27</sub>, für H oder gegebenenfalls substituiertes Alkyl oder Aryl steht,

5

Aa<sub>21</sub> für O, S, Se, Te, N-Ra<sub>28</sub>, C(Ra<sub>29</sub>)(Ra<sub>210</sub>), -C(Ra<sub>211</sub>)=C(Ra<sub>212</sub>)-,

wobei

10 Ra<sub>28</sub> bis Ra<sub>212</sub> für H oder gegebenenfalls substituiertes Alkyl, Aryl, oder  
Alkenyl mit bis zu 20 C-Atomen stehen können,

mit der Maßgabe, dass mindestens einer der Substituenten Ra<sub>21</sub> bis Ra<sub>25</sub> bzw. Ra<sub>27</sub>  
bis Ra<sub>212</sub> ausgewählt ist aus der Gruppe, die gebildet wird durch -(CH<sub>2</sub>)<sub>1</sub>-SO<sub>2</sub>-  
15 Z-SO<sub>2</sub>-R, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1</sub>-CO-Z-SO<sub>2</sub>-R, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1</sub>-SO<sub>2</sub>-Z-CO-R, und-(CH<sub>2</sub>)<sub>1</sub>-N(R)-SO<sub>3</sub>  
,

wobei

20 1 für eine Zahl zwischen 1 und 6,

Z für NH oder N<sup>-</sup> steht und

R bevorzugt für gegebenenfalls substituiertes Alkyl oder Aryl steht.

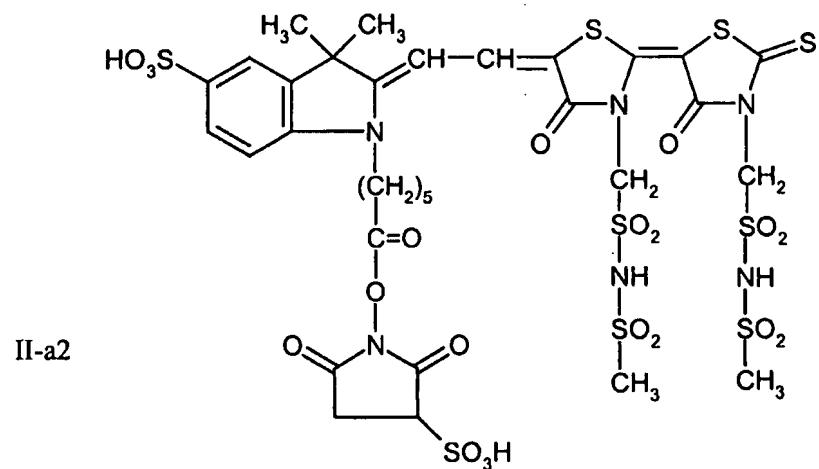
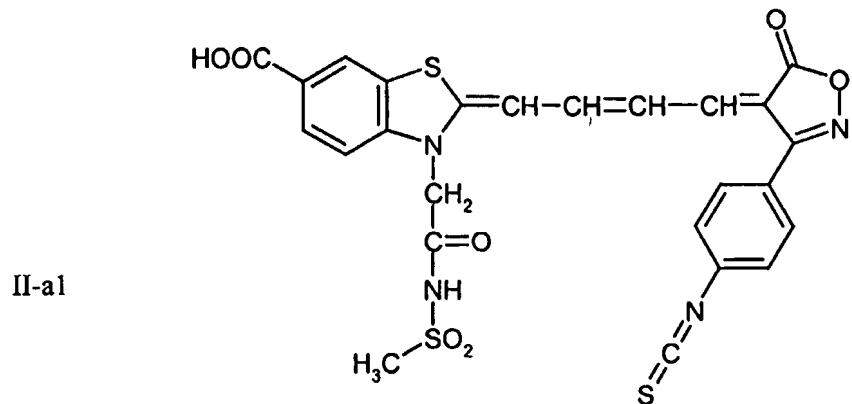
25

Vorzugsweise bilden die Substituenten Ra<sub>22</sub> bis Ra<sub>25</sub> die restlichen Glieder eines  
carbo- bzw. heterocyclischen Ringsystems, das bis zu 4 Ringen enthalten kann, die  
gegebenenfalls mehrere Substituenten tragen können. Ra<sub>22</sub> kann zusammen mit Ra<sub>25</sub>  
eine π-Bindung bilden und Ra<sub>23</sub> und Ra<sub>24</sub> können Substituenten darstellen.

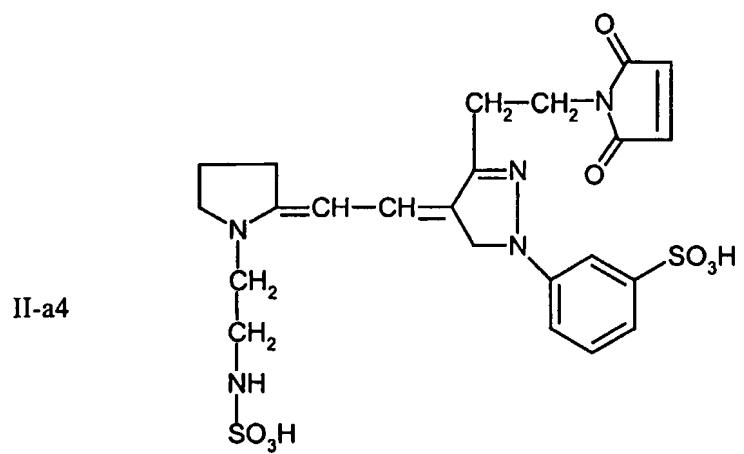
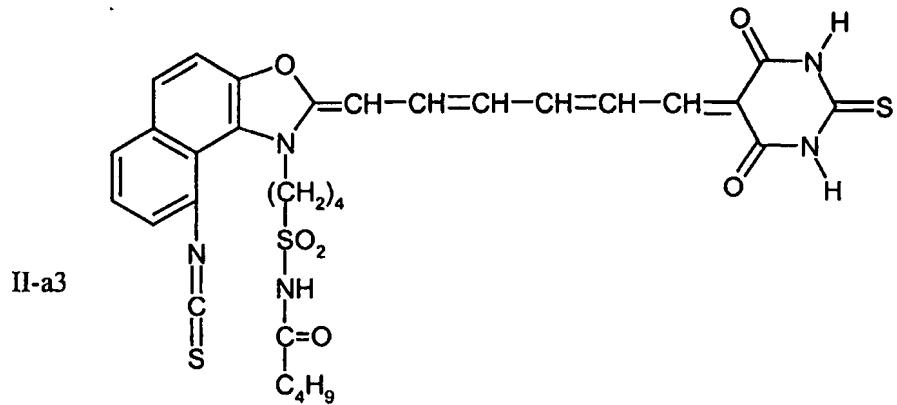
30

- 25 -

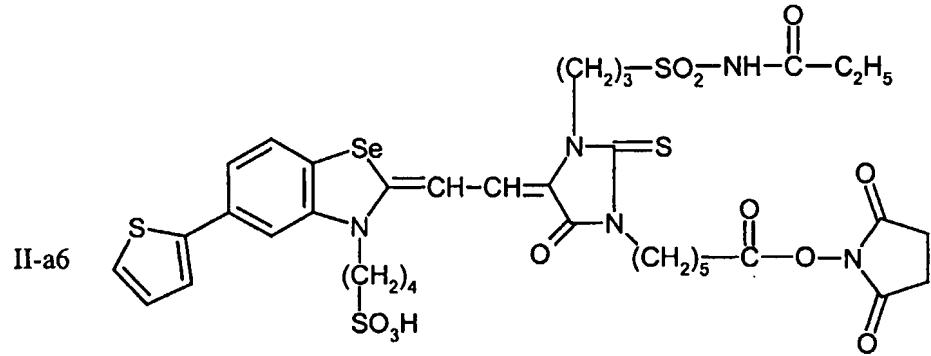
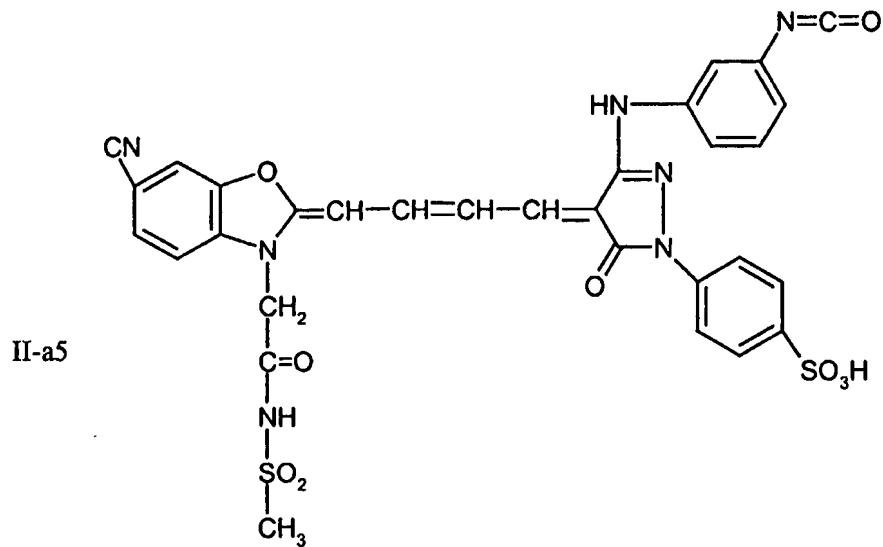
**Besonders bevorzugte Verbindungen der Formel 2a:**



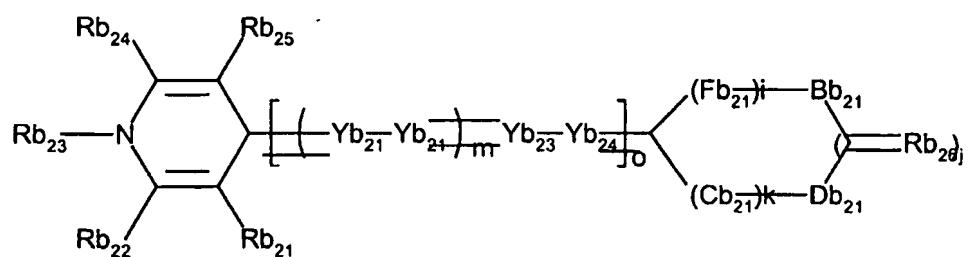
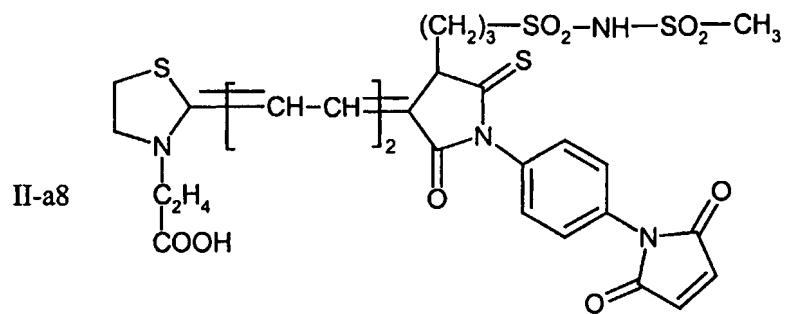
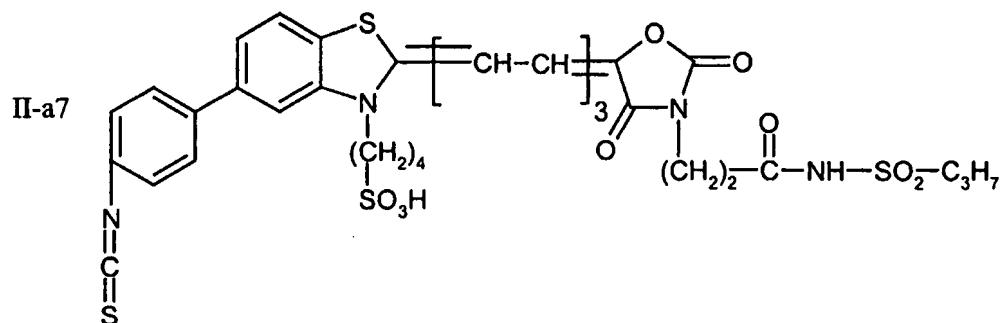
- 26 -



- 27 -



- 28 -



Formel 2-b

in der

5

Rb<sub>21</sub> bis Rb<sub>25</sub> unabhängig voneinander für einen beliebigen Substituenten stehen.

- 29 -

$Yb_{21}$ ,  $Yb_{22}$ ,  $Yb_{23}$ ,  $Yb_{24}$  unabhängig voneinander für substituiertes oder unsubstituiertes C oder N stehen, wobei die Substituenten auch einen 5-oder 6gliedrigen, aliphatischen oder aromatischen Carbo-oder Heterocyclus bilden können.

5

m für 0,1,2,3 oder 4 steht

o für 0,1,2,3 oder 4 steht

10  $Fb_{21}$  und  $Cb_{21}$  unabhängig voneinander für C=O, C=S oder C( $Rb_{27}$ )=,

$Bb_{21}$  und  $Db_{21}$  unabhängig voneinander für gegebenenfalls substituiertes C, N, O oder S steht,

15  $Rb_{26}$  für O, S, oder einen weiteren heterocyclischen, gegebenenfalls substituierten 5-oder 6-gliedrigen Ring steht

k,i,und j unabhängig voneinander für 0 oder 1 stehen

20  $Rb_{27}$  für H oder gegebenenfalls substituiertes Alkyl oder Aryl steht,

Vorzugsweise können folgende Substituenten einen 5-oder 6gliedrigen Carbo- oder Heterocyclus bilden, der gegebenenfalls auch annelliert ist:

25 Der Substituent  $Rb_{23}$  zusammen mit  $Rb_{24}$  und/oder  $Rb_{22}$ , der Substituent  $Rb_{22}$  zusammen mit  $Rb_{21}$  und/oder  $Rb_{23}$ , der Substituent  $Rb_{24}$  zusammen mit  $Rb_{25}$  und/oder  $Rb_{23}$ .

$Ab_{21}$ : O, S, Se, Te, N- $Rb_{28}$ , C( $Rb_{29}$ )( $Rb_{210}$ ), -C( $Rb_{211}$ )=C( $Rb_{212}$ )-,

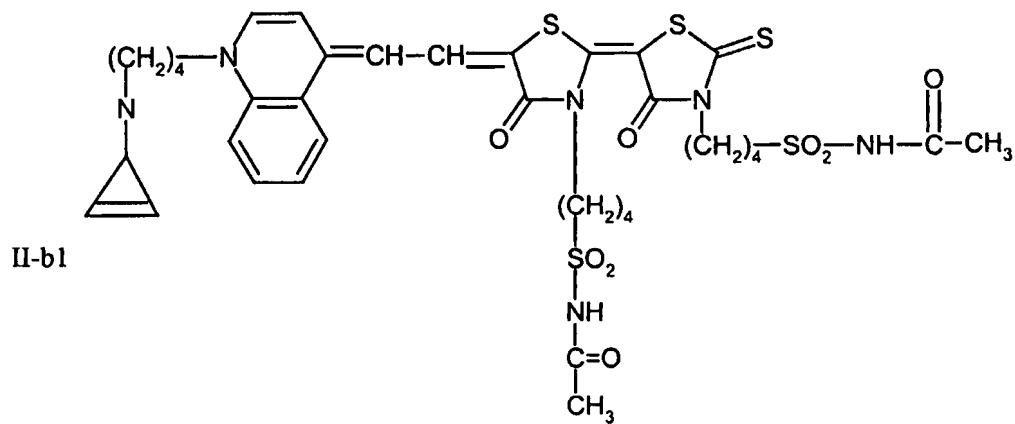
30

- 30 -

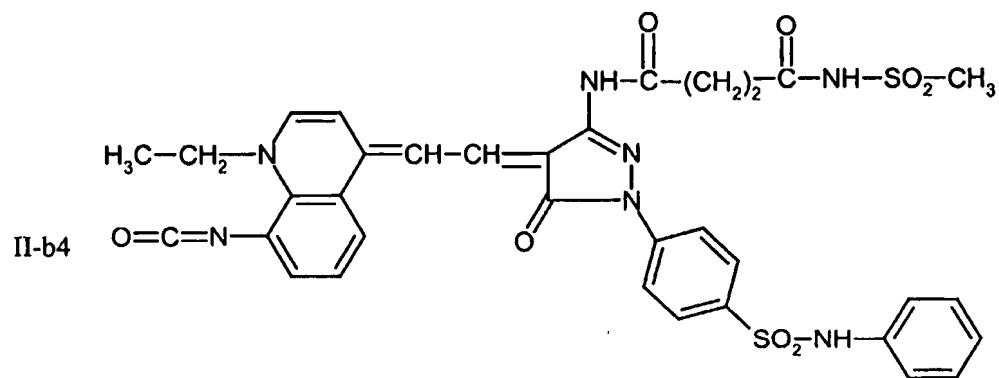
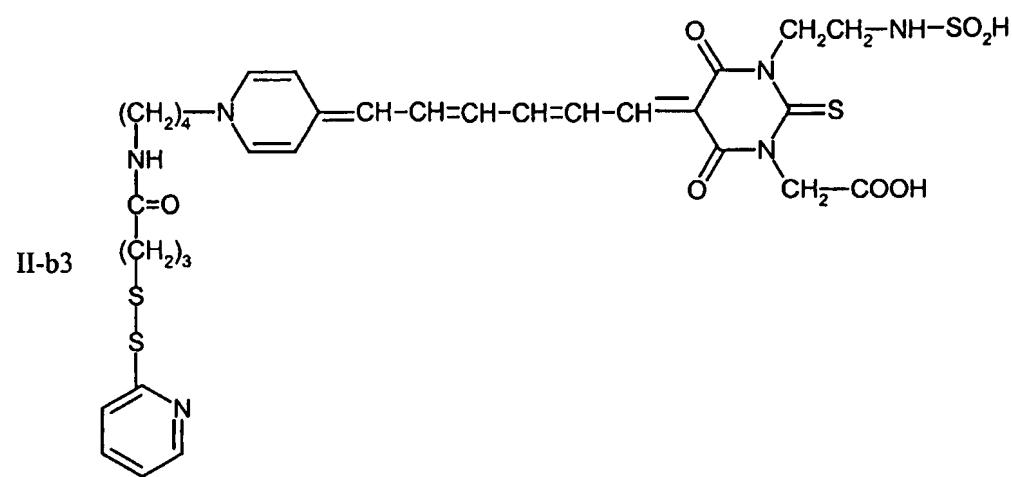
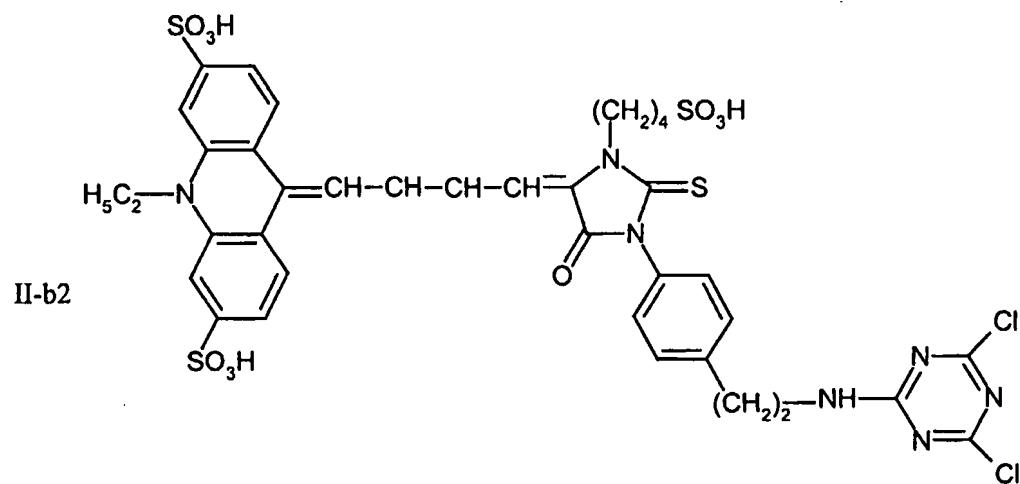
Rb<sub>28</sub> bis Rb<sub>212</sub> können sein Wasserstoff, ggf. substituiertes Alkyl oder gegebenenfalls substituiertes Aryl, gegebenenfalls substituiertes Alkenyl, mit bis zu 20 C-Atomen, oder einer der unten angegebenen Substituenten,

- 5      mit der Maßgabe, dass mindestens einer der Substituenten Rb<sub>21</sub> bis Rb<sub>25</sub> bzw. Rb<sub>27</sub> bis Rb<sub>212</sub> ausgewählt ist aus der Gruppe, die gebildet wird durch -(CH<sub>2</sub>)<sub>1</sub>-SO<sub>2</sub>-Z-SO<sub>2</sub>-R, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1</sub>-CO-Z-SO<sub>2</sub>-R, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1</sub>-SO<sub>2</sub>-Z-CO-R, und -(CH<sub>2</sub>)<sub>1</sub>-N(R)-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>,
- 10     wobei
  - I      für eine Zahl zwischen 1 und 6,
  - Z      für NH oder N<sup>-</sup> steht und
- 15     R      bevorzugt für gegebenenfalls substituiertes Alkyl oder Aryl steht.

**Besonders bevorzugte Verbindungen der Formel 2b**



- 31 -

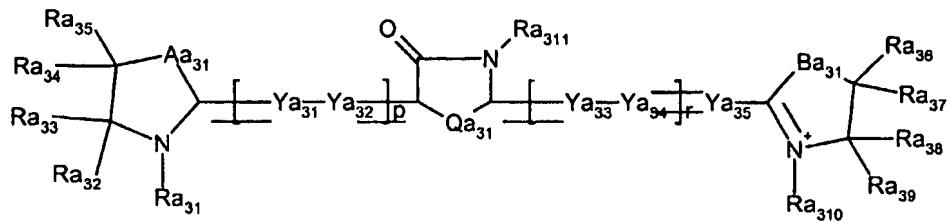


I-b5

## Rhodacyanine

Als Rhodacyanine im Sinn der vorliegenden Anmeldung werden insbesondere solche der Formeln 3a und/ oder 3b eingesetzt.

5



### Formel 3-a

in der

10

Ra<sub>31</sub> bis Ra<sub>311</sub> unabhängig voneinander für einen beliebigen Substituenten stehen,

15 Ya<sub>31</sub>, Ya<sub>32</sub>, Ya<sub>33</sub>, Ya<sub>34</sub>, Ya<sub>35</sub> unabhängig voneinander für substituiertes oder unsubstituiertes C bzw. N stehen, wobei die Substituenten auch einen 5-oder 6gliedrigen, aliphatischen oder aromatischen Carbo-oder Heterocyclus bilden können,

p und r unabhängig voneinander für 0,1 oder 2

20 Qa<sub>31</sub> für O; N(Ra<sub>312</sub>), S oder Se

Aa<sub>31</sub>, Ba<sub>3</sub> unabhängig voneinander für O, S, Se, Te, N-Ra<sub>313</sub>, C(Ra<sub>314</sub>) (Ra<sub>315</sub>) oder -C(Ra<sub>316</sub>)=C(Ra<sub>317</sub>)- stehen, wobei Ra<sub>312</sub> bis Ra<sub>317</sub> für H, gegebenenfalls substituiertes Alkyl, Aryl oder Alkenyl, mit bis zu 20 C-Atomen oder für einen beliebigen Substituenten stehen können.

mit der Maßgabe, dass mindestens einer der Substituenten Ra<sub>31</sub> bis Ra<sub>317</sub> ausgewählt ist aus der Gruppe, die gebildet wird durch -(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-SO<sub>2</sub>-Z-SO<sub>2</sub>-R, -(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-CO-Z-SO<sub>2</sub>-R, -(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-SO<sub>2</sub>-Z-CO-R, und-(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-N(R)-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>,

5 wobei

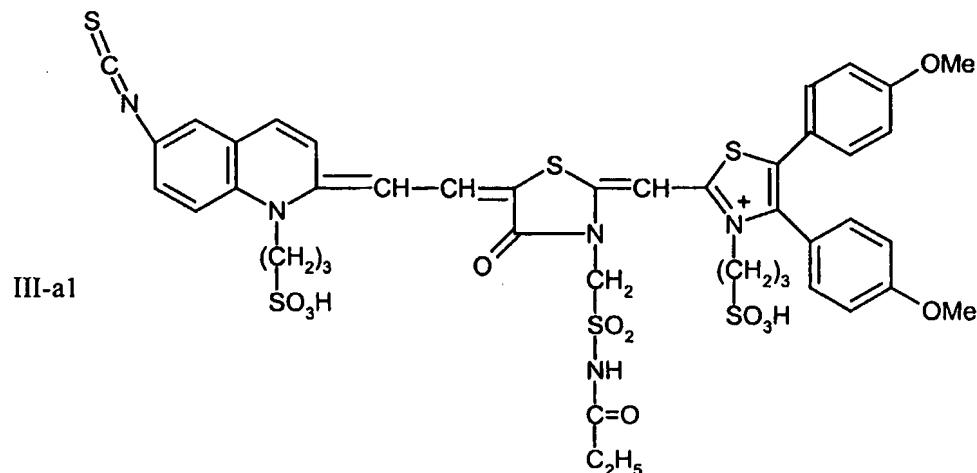
1 für eine Zahl zwischen 1 und 6,

Z für NH oder N<sup>-</sup> steht und

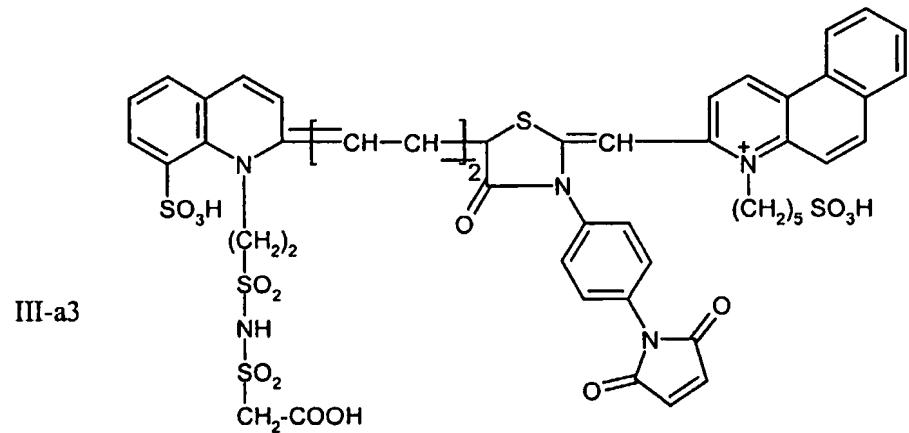
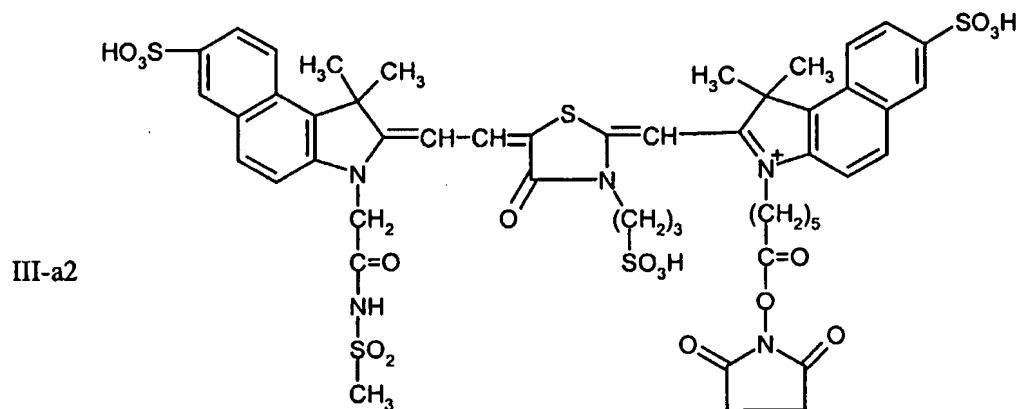
10 R bevorzugt für gegebenenfalls substituiertes Alkyl oder Aryl steht.

In einer bevorzugten Ausführungsform bilden die Substituenten Ra<sub>32</sub> bis Ra<sub>35</sub> bzw. Ra<sub>36</sub> bis Ra<sub>39</sub> die restlichen Glieder eines carbo-bzw. heterocyclischen Ringsystems, das bis zu 4 Ringen enthalten kann, die gegebenenfalls mehrere Substituenten tragen können. Ra<sub>32</sub> kann zusammen mit Ra<sub>35</sub> und /oder Ra<sub>36</sub> zusammen mit Ra<sub>39</sub> eine π-Bindung bilden und Ra<sub>33</sub> und Ra<sub>34</sub> bzw. Ra<sub>37</sub> und Ra<sub>38</sub> können Substituenten darstellen.

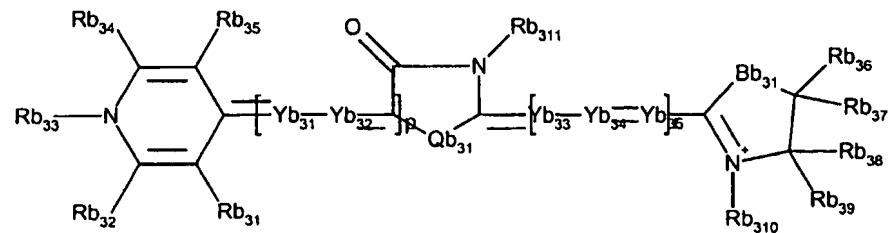
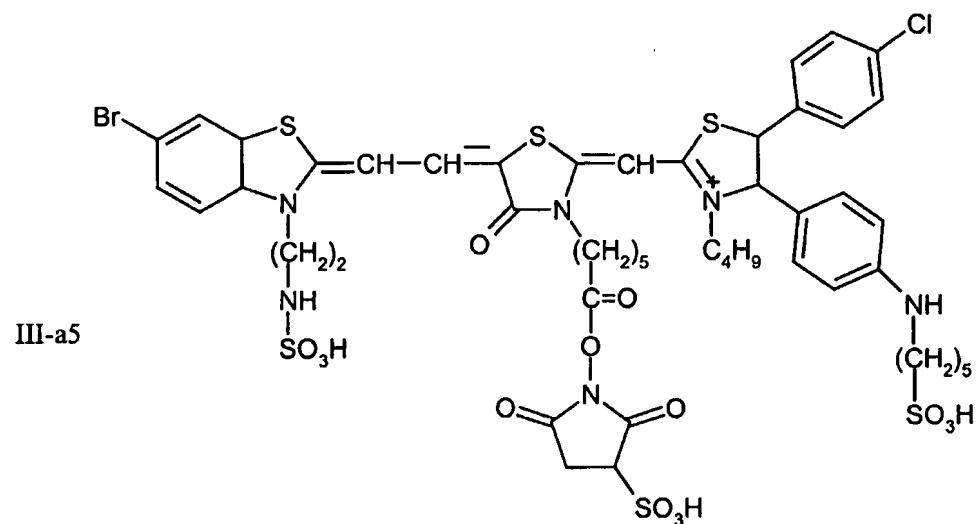
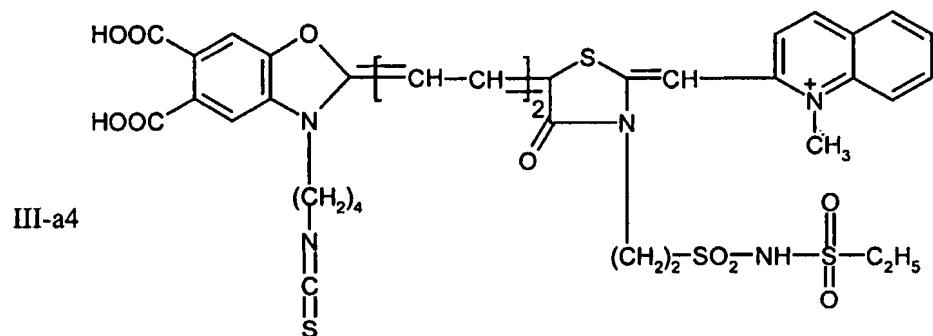
### Besonders bevorzugte Verbindungen der Formel 3a



- 34 -



- 35 -



Formel 3-b

- 36 -

Rb<sub>31</sub> bis Rb<sub>311</sub> unabhängig voneinander für einen beliebigen Substituenten stehen,

Yb<sub>31</sub>, Yb<sub>32</sub>, Yb<sub>33</sub>, Yb<sub>34</sub>, Yb<sub>35</sub> unabhängig voneinander für substituiertes oder unsubstituiertes C bzw. N stehen, wobei die Substituenten auch einen 5-oder 6gliedrigen, aliphatischen oder aromatischen Carbo-oder Heterocyclus bilden können,

p und r unabhängig voneinander für 0,1 oder 2  
10

Qb<sub>31</sub> für O; N(Rb<sub>312</sub>), S oder Se

15 Ab<sub>31</sub>, Bb<sub>31</sub> unabhängig voneinander für O, S, Se, Te, N-Rb<sub>313</sub>, C(Rb<sub>314</sub>)(Rb<sub>315</sub>) oder -C(Rb<sub>316</sub>)=C(Rb<sub>317</sub>)- stehen, wobei Rb<sub>311</sub> bis Rb<sub>317</sub> für H, gegebenenfalls substituiertes Alkyl, Aryl oder Alkenyl, mit bis zu 20 C-Atomen oder für einen beliebigen Substituenten stehen können,

20 mit der Maßgabe, dass mindestens einer der Substituenten Rb<sub>31</sub> bis Rb<sub>317</sub> ausgewählt ist aus der Gruppe, die gebildet wird durch -(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-SO<sub>2</sub>-Z-SO<sub>2</sub>-R, -(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-CO-Z-SO<sub>2</sub>-R, -(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-SO<sub>2</sub>-Z-CO-R, und-(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-N(R)-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>,

wobei

25 l für eine Zahl zwischen 1 und 6,  
Z für NH oder N<sup>-</sup> steht und

R bevorzugt für gegebenenfalls substituiertes Alkyl oder Aryl steht.

30 In einer bevorzugten Ausführungsform bilden die Substituenten Rb<sub>36</sub> bis Rb<sub>39</sub> die restlichen Glieder eines carbo- bzw. heterocyclischen Ringsystems, das bis zu 4

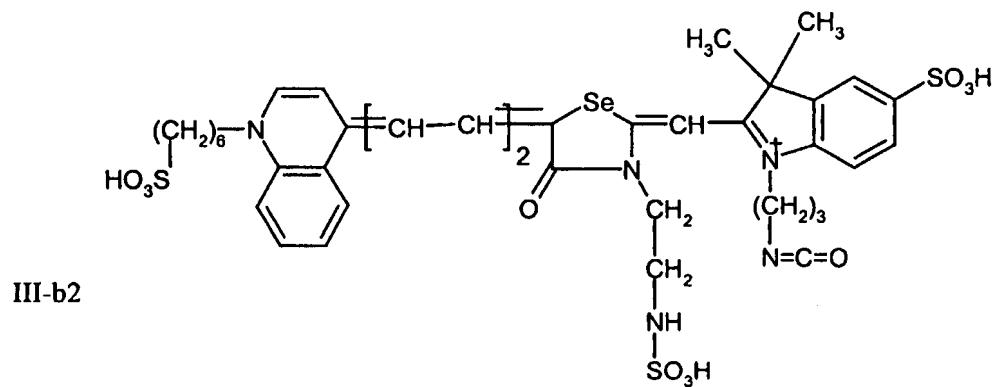
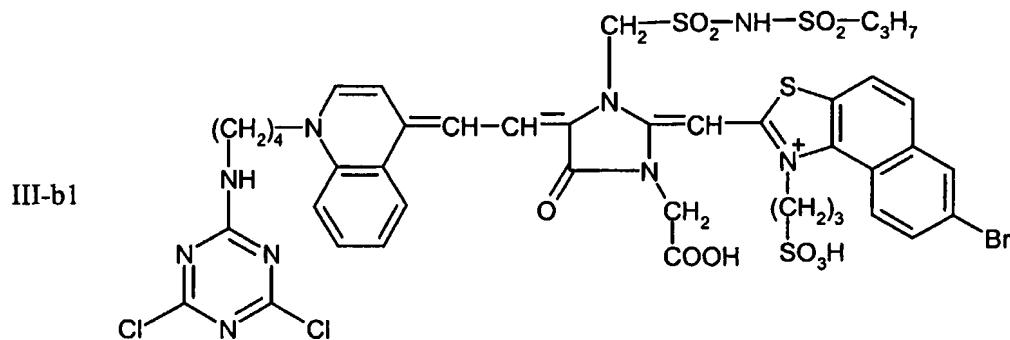
- 37 -

Ringe enthalten kann, die gegebenenfalls mehrere Substituenten tragen können. Rb<sub>36</sub> kann zusammen mit Rb<sub>39</sub> eine  $\pi$ -Bindung bilden und Ra<sub>37</sub> und Ra<sub>38</sub> können Substituenten darstellen. Folgende Substituenten können einen 5-oder 6gliedrigen Carbocyclischen oder Heterocyclus bilden, der ggf. auch annellierte ist:

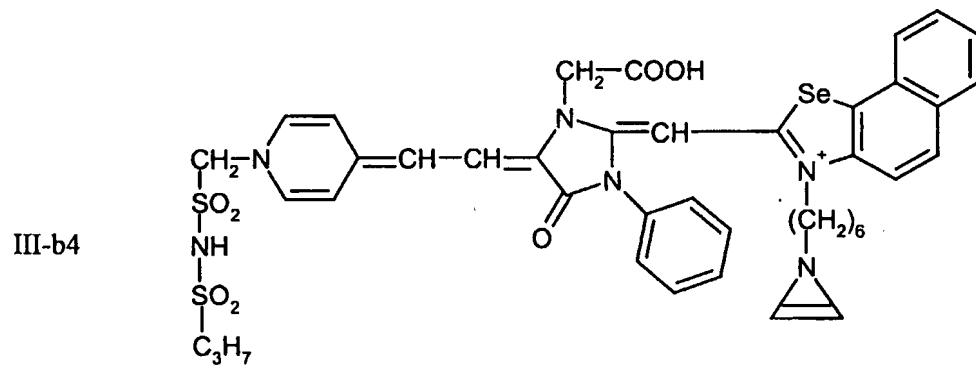
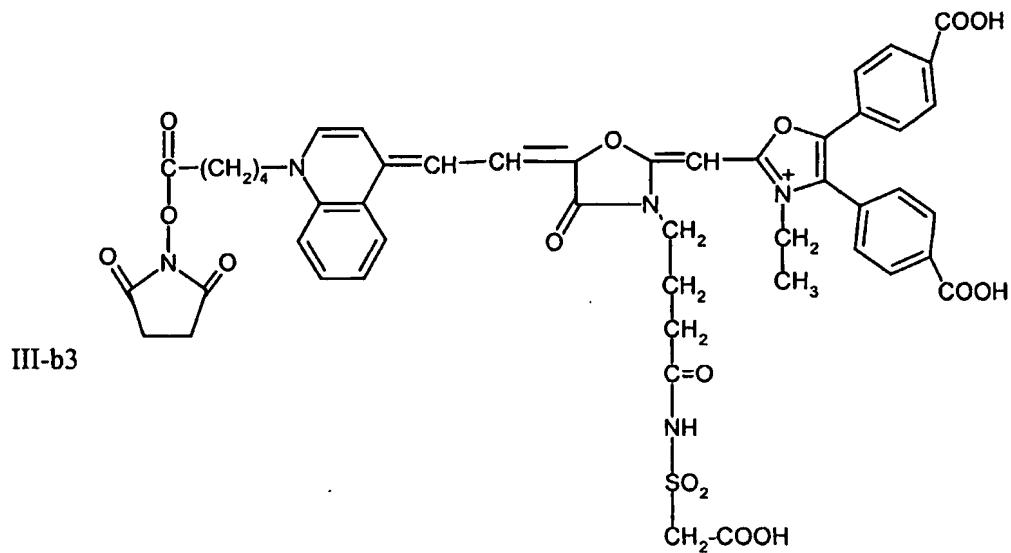
5

Der Substituent Rb<sub>33</sub> zusammen mit Rb<sub>32</sub> und/oder Rb<sub>34</sub>, der Substituent Rb<sub>32</sub> zusammen mit Rb<sub>33</sub> und/oder Rb<sub>31</sub>, der Substituent Rb<sub>34</sub> zusammen mit Rb<sub>35</sub> und/oder Rb<sub>33</sub>.

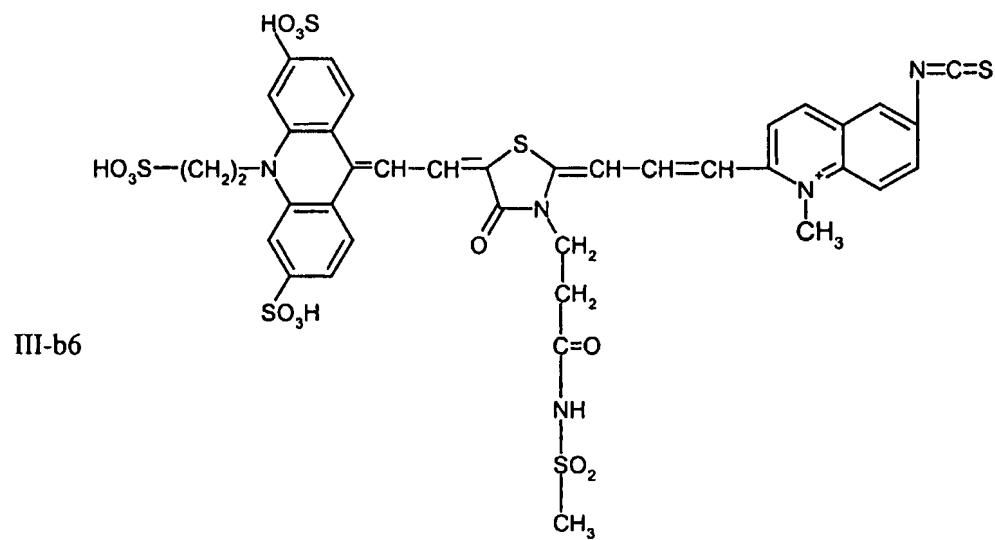
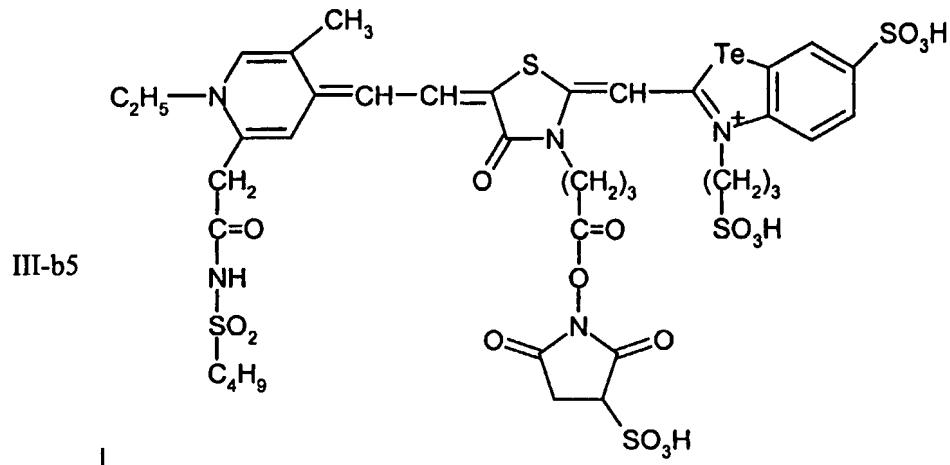
#### Besonders bevorzugte Verbindungen der Formel 3b



- 38 -



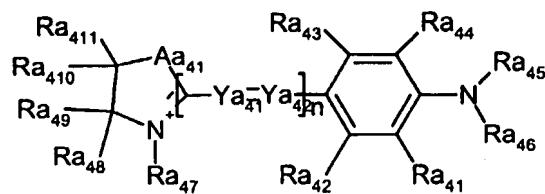
- 39 -



### Styrylfarbstoffe

Besonders bevorzugt einzusetzende Styrylfarbstoffe im Sinne der vorliegenden Erfindung sind die Verbindungen der Formeln 4a, 4b, 4c und/ oder 4d.

- 40 -



Formel 4-a

5 in der

Ra<sub>41</sub> bis Ra<sub>411</sub> unabhängig voneinander für einen beliebigen Substituenten stehen ,

10 Ya<sub>41</sub> und Ya<sub>42</sub> unabhängig voneinander für substituiertes oder unsubstituiertes C bzw. N, wobei die Substituenten auch einen 5-oder 6gliedrigen, aliphatischen oder aromatischen Carbo-oder Heterocyclus bilden können.

15 Aa<sub>4</sub> für O, S, Se, Te, N-Ra<sub>412</sub>, C(Ra<sub>413</sub>)(Ra<sub>414</sub>) oder -C(Ra<sub>415</sub>)=C(Ra<sub>416</sub>)-, steht, wobei Ra<sub>412</sub> bis Ra<sub>416</sub> für H, gegebenenfalls substituiertes Alkyl, Aryl, oder Alkenyl, mit bis zu 20 C-Atomen oder einen beliebigen Substituenten stehen können,

20 mit der Maßgabe, dass mindestens einer der Substituenten Ra<sub>41</sub> bis Ra<sub>416</sub> ausgewählt ist aus der Gruppe, die gebildet wird durch -(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-SO<sub>2</sub>-Z-SO<sub>2</sub>-R, -(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-CO-Z-SO<sub>2</sub>-R, -(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-SO<sub>2</sub>-Z-CO-R, und-(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-N(R)-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>,

wobei

25 l für eine Zahl zwischen 1 und 6,

Z für NH oder N<sup>-</sup> steht und

- 41 -

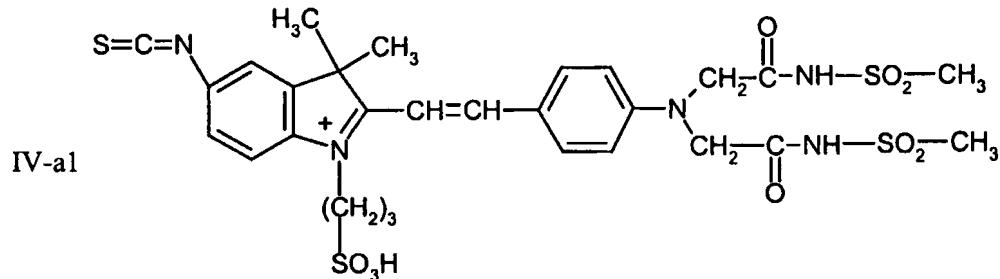
R bevorzugt für gegebenenfalls substituiertes Alkyl oder Aryl steht.

In einer bevorzugten Ausführungsform bilden die Substituenten Ra<sub>48</sub> bis Ra<sub>411</sub> die restlichen Glieder eines carbo- bzw. heterocyclischen Ringsystems, das bis zu 4 Ringen enthalten kann, die gegebenenfalls mehrere Substituenten tragen können.  
 5 Ra<sub>48</sub> kann zusammen mit Ra<sub>411</sub> eine  $\pi$ -Bindung bilden und Ra<sub>49</sub> und Ra<sub>410</sub> können Substituenten darstellen.

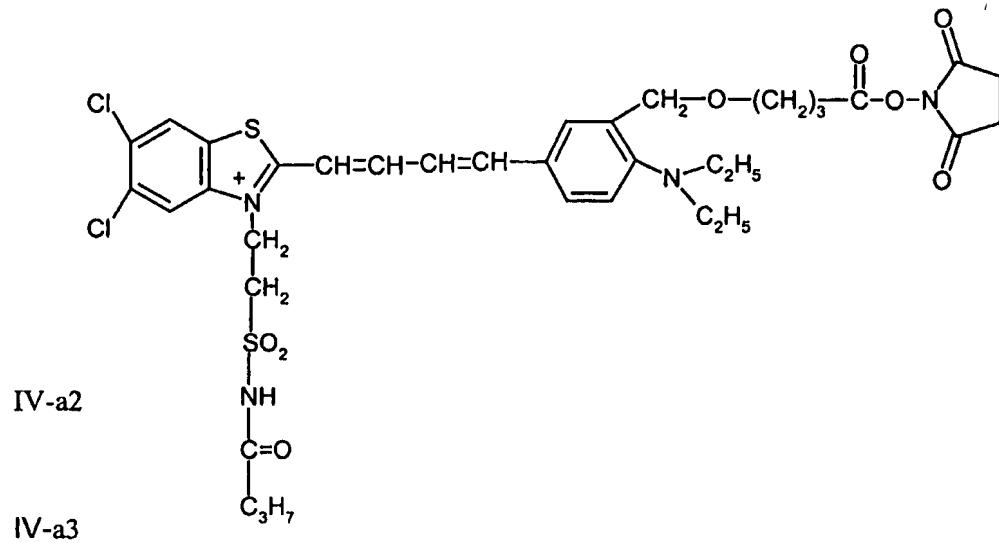
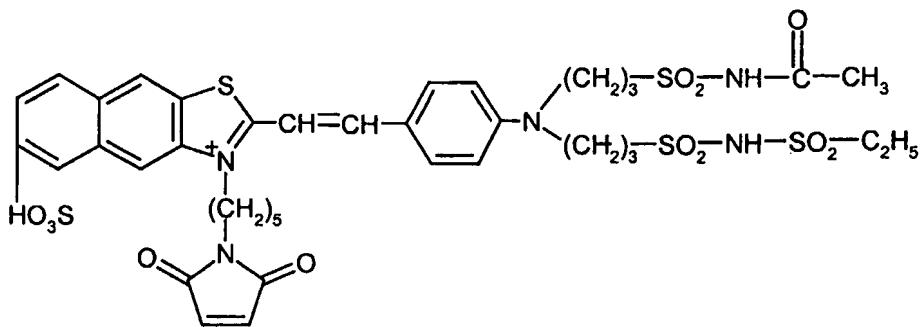
Folgende Substituenten können einen 5-oder 6gliedrigen Carbo-oder Heterocyclus  
 10 bilden, der gegebenenfalls auch annellierte ist:

Der Substituent Ra<sub>45</sub> zusammen mit Ra<sub>46</sub> oder Ra<sub>45</sub> mit Ra<sub>44</sub>, oder Ra<sub>46</sub> mit Ra<sub>41</sub>, und/oder Ra<sub>41</sub> mit Ra<sub>42</sub> und/oder Ra<sub>44</sub> mit Ra<sub>43</sub>.

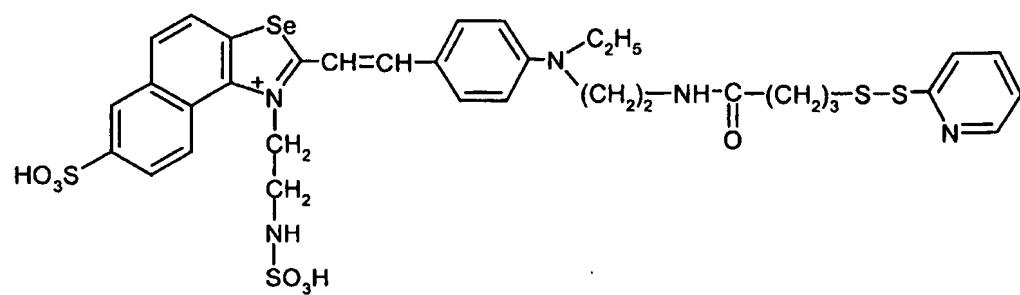
**Besonders bevorzugte Verbindungen der Formel 4a**



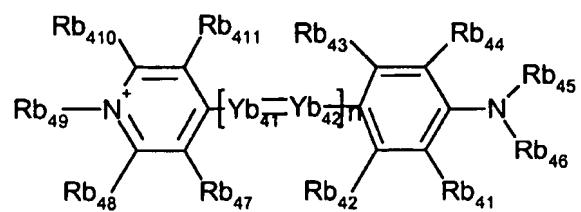
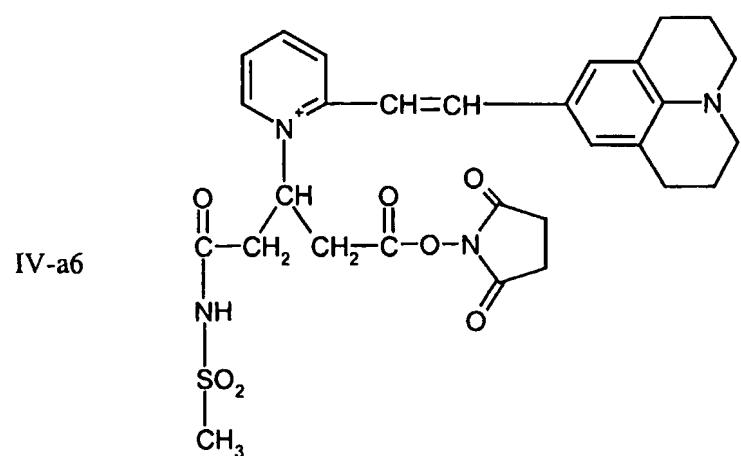
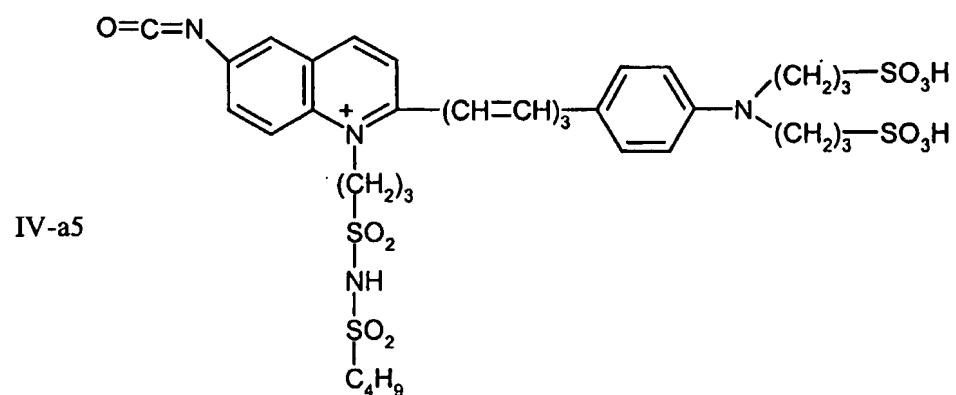
- 42 -

**IV-a3**

**IV-a4**  
**a4**



- 43 -



Formel 4-b

- 44 -

in der

Rb<sub>41</sub> bis Rb<sub>411</sub> unabhängig voneinander für einen beliebigen Substituenten stehen ,

5

Yb<sub>41</sub> und Yb<sub>42</sub> unabhängig voneinander für substituiertes oder unsubstituiertes C bzw. N, wobei die Substituenten auch einen 5-oder 6-gliedrigen, aliphatischen oder aromatischen Carbo-oder Heterocyclus bilden können und

10

n für 0,1,2,3, 4 oder 5 steht,

mit der Maßgabe, dass mindestens einer der Substituenten Rb<sub>41</sub> bis Rb<sub>411</sub> ausgewählt

ist aus der Gruppe, die gebildet wird durch -(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-SO<sub>2</sub>-Z-SO<sub>2</sub>-R,

15

-(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-CO-Z-SO<sub>2</sub>-R, -(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-SO<sub>2</sub>-Z-CO-R, und-(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-N(R)-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>,

wobei

l für eine Zahl zwischen 1 und 6,

20

Z für NH oder N<sup>-</sup> steht und

R bevorzugt für gegebenenfalls substituiertes Alkyl oder Aryl steht.

25

In einer bevorzugten Ausführungsform bilden folgende Substituenten einen 5-oder 6gliedrigen Carbo-oder Heterocyclus, der gegebenenfalls auch annelliert ist:

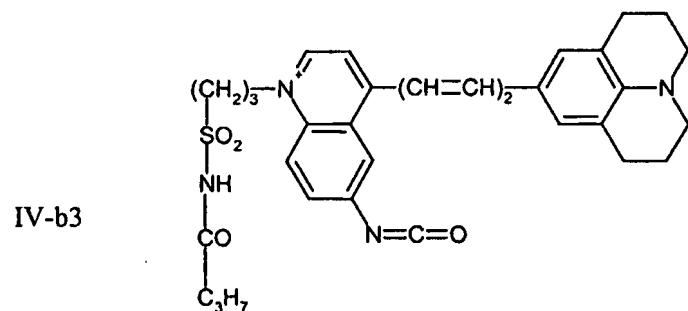
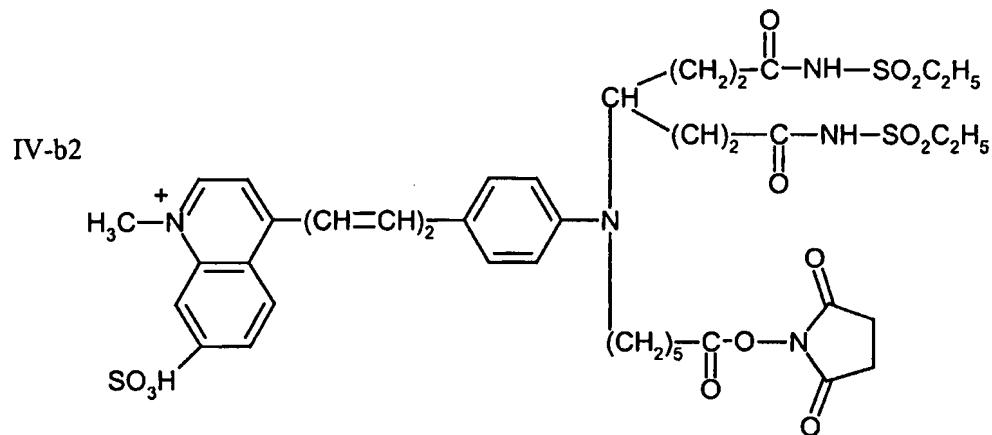
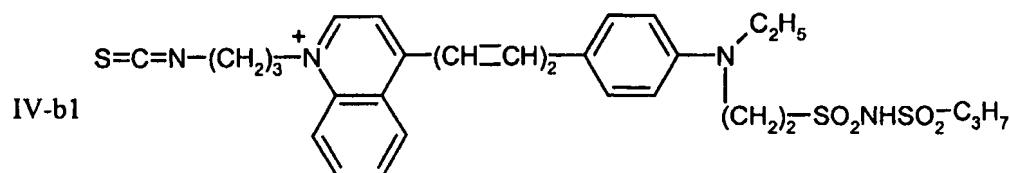
Der Substituent Rb<sub>45</sub> zusammen mit Rb<sub>46</sub> und/oder Rb<sub>45</sub> mit Rb<sub>44</sub>, und/oder Rb<sub>46</sub> mit Rb<sub>41</sub>, und/oder Rb<sub>41</sub> mit Rb<sub>42</sub> und/oder Rb<sub>44</sub> mit Rb<sub>43</sub>.

30

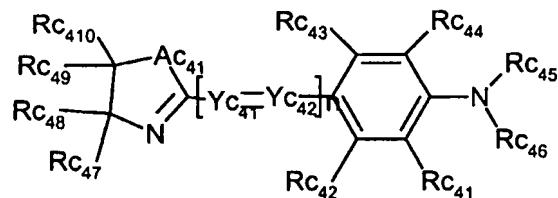
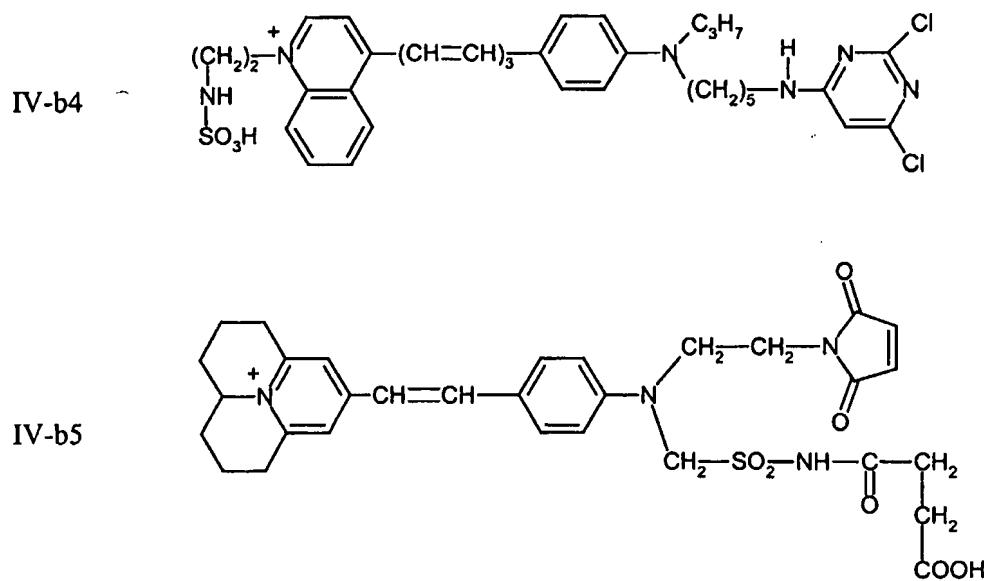
- 45 -

Der Substituent Rb<sub>49</sub> zusammen mit Rb<sub>410</sub> und/oder Rb<sub>48</sub>, der Substituent Rb<sub>410</sub> zusammen mit Rb<sub>411</sub> und/oder der Substituent Rb<sub>48</sub> zusammen mit Rb<sub>47</sub>.

**Besonders bevorzugte Verbindungen der Formel 4b**



- 46 -



Formel 4-c

5 in der

Rc<sub>41</sub> bis Rc<sub>410</sub> unabhängig voneinander für einen beliebigen Substituenten stehen ,

10 Yc<sub>41</sub> und Yc<sub>42</sub> unabhängig voneinander für substituiertes oder unsubstituiertes C bzw. N, wobei die Substituenten auch einen 5-oder 6-gliedrigen, aliphatischen oder aromatischen Carbo-oder Heterocyclus bilden können,

15 Ac<sub>41</sub> für O, S, Se, Te, N-Rc<sub>411</sub>, C(Rc<sub>412</sub>)(Rc<sub>413</sub>) oder -C(Rc<sub>414</sub>)=C(Rc<sub>415</sub>)-, steht, wobei Rc<sub>411</sub> bis Rc<sub>415</sub> für H, ge-

- 47 -

gegebenenfalls substituiertes Alkyl, Aryl, oder Alkenyl, mit bis zu 20 C-Atomen oder einen beliebigen Substituenten stehen können und

5 n für 0,1,2,3,4 oder 5 stehen kann,

mit der Maßgabe, dass mindestens einer der Substituenten Rc<sub>41</sub> bis Rc<sub>415</sub> ausgewählt ist aus der Gruppe, die gebildet wird durch -(CH<sub>2</sub>)<sub>i</sub>-SO<sub>2</sub>-Z-SO<sub>2</sub>-R, -(CH<sub>2</sub>)<sub>i</sub>-CO-Z-SO<sub>2</sub>-R, -(CH<sub>2</sub>)<sub>i</sub>-SO<sub>2</sub>-Z-CO-R, und-(CH<sub>2</sub>)<sub>i</sub>-N(R)-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>,

10

wobei

1 für eine Zahl zwischen 1 und 6,

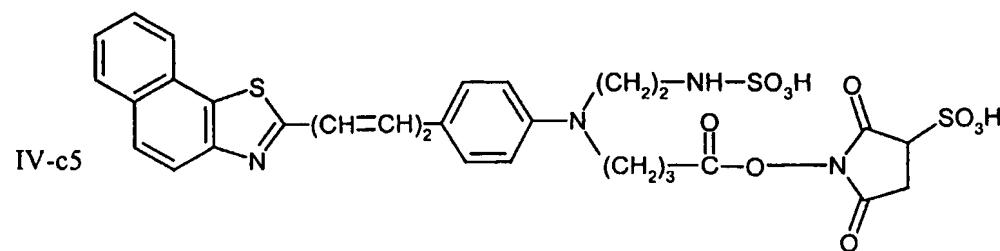
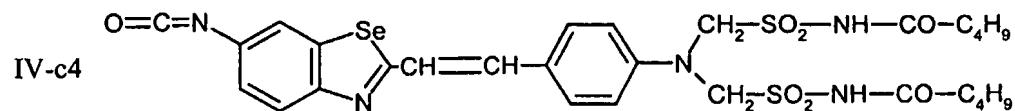
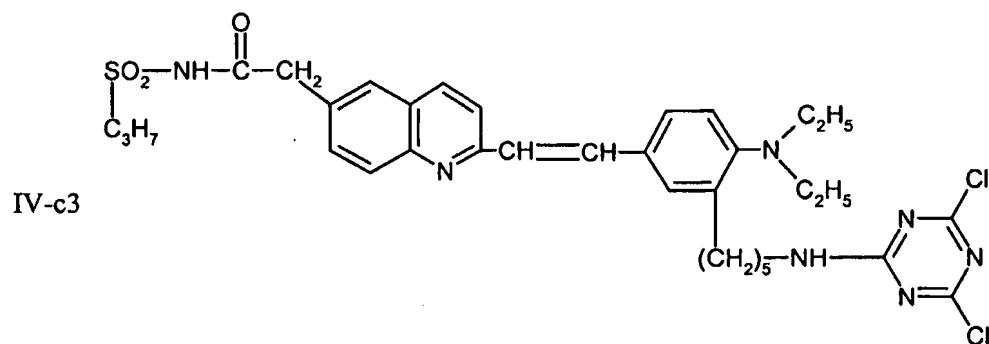
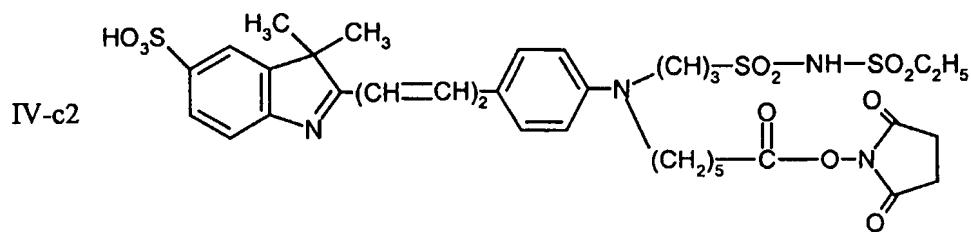
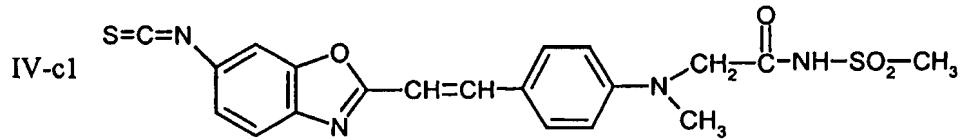
15 Z für NH oder N<sup>+</sup> steht und

R bevorzugt für gegebenenfalls substituiertes Alkyl oder Aryl steht.

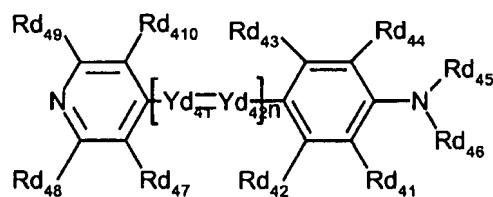
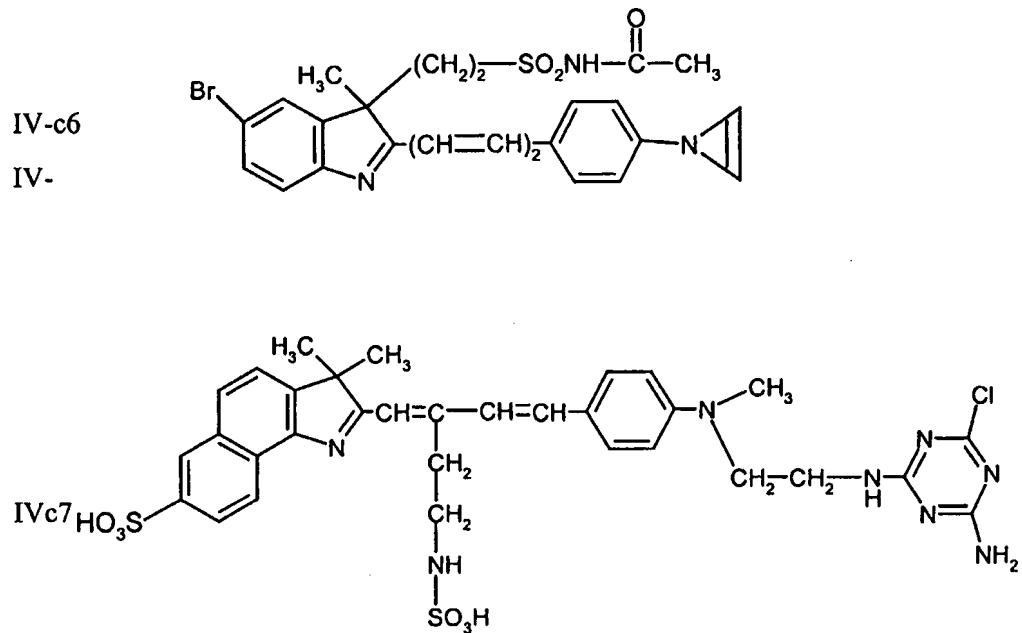
In einer bevorzugten Ausführungsform können folgende Substituenten einen 5-oder 20 6gliedrigen Carbo-oder Heterocyclus bilden, der gegebenenfalls auch annelliert ist:  
Der Substituent Rc<sub>45</sub> zusammen mit Rc<sub>46</sub> oder Rc<sub>45</sub> mit Rc<sub>44</sub>, oder Rc<sub>46</sub> mit Rc<sub>41</sub>, und/oder Rc<sub>41</sub> mit Rc<sub>42</sub> und/oder Rc<sub>44</sub> mit Rc<sub>43</sub>.

Die Substituenten Rc<sub>47</sub> bis Rc<sub>410</sub> bilden die restlichen Glieder eines carbo-bzw. 25 heterocyclischen Ringsystems, das bis zu 4 Ringen enthalten kann, die gegebenenfalls mehrere Substituenten tragen können. Rc<sub>47</sub> kann zusammen mit Rc<sub>410</sub> eine π-Bindung bilden und Rc<sub>48</sub> und Rc<sub>49</sub> können Substituenten darstellen.

**Besonders bevorzugt einzusetzende Verbindungen der Formel 4c**



- 49 -



Formel 4-d

5 in der

Rd<sub>41</sub> bis Rd<sub>410</sub> unabhängig voneinander für einen beliebigen Substituenten stehen ,

- 50 -

Yd<sub>41</sub> und Yd<sub>42</sub> unabhängig voneinander für substituiertes oder unsubstituiertes C bzw. N, wobei die Substituenten auch einen 5-oder 6gliedrigen, aliphatischen oder aromatischen Carbo-oder Heterocyclus bilden können und

5

n für 0,1,2,3,4 oder 5 stehen kann,

mit der Maßgabe, dass mindestens einer der Substituenten Rd<sub>41</sub> bis Rd<sub>410</sub> ausgewählt ist aus der Gruppe, die gebildet wird durch -(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-SO<sub>2</sub>-Z-SO<sub>2</sub>-R,  
10 -(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-CO-Z-SO<sub>2</sub>-R, -(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-SO<sub>2</sub>-Z-CO-R, und-(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-N(R)-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>,

wobei

1 für eine Zahl zwischen 1 und 6,

15

Z für NH oder N<sup>-</sup> steht und

R bevorzugt für gegebenenfalls substituiertes Alkyl oder Aryl steht.

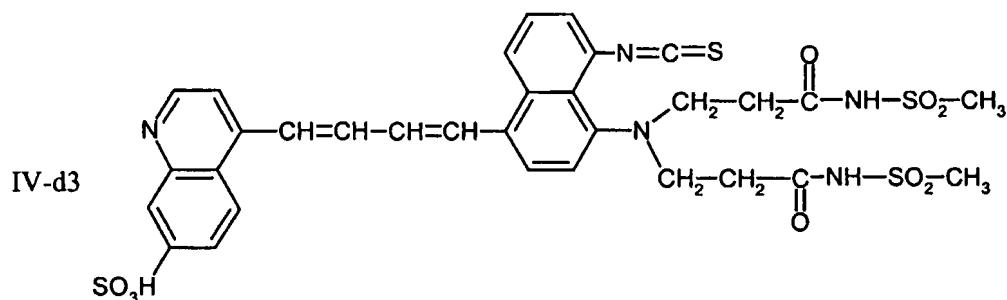
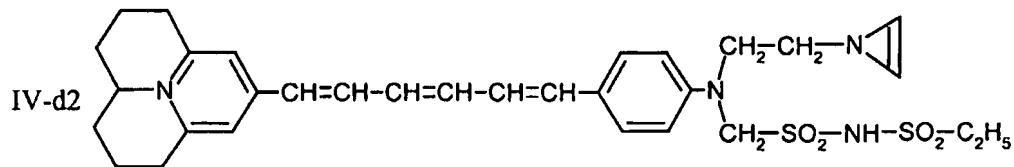
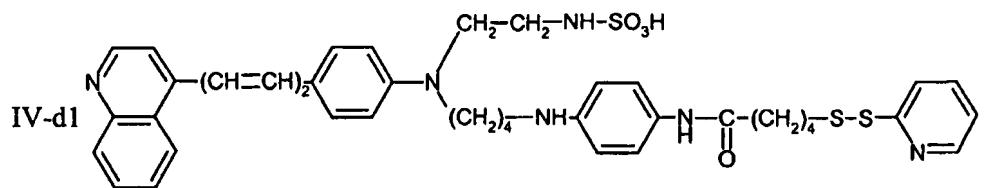
20 In einer bevorzugten Ausführungsform können folgende Substituenten einen 5-oder 6gliedrigen Carbo-oder Heterocyclus bilden, der gegebenenfalls auch annelliert ist:

Der Substituent Rd<sub>45</sub> zusammen mit Rd<sub>46</sub> und/oder Rd<sub>45</sub> mit Rd<sub>44</sub>, und/oder Rd<sub>46</sub> mit Rd<sub>41</sub>, und/oder Rd<sub>41</sub> mit Rd<sub>42</sub> und/oder Rd<sub>44</sub> mit Rd<sub>43</sub>.

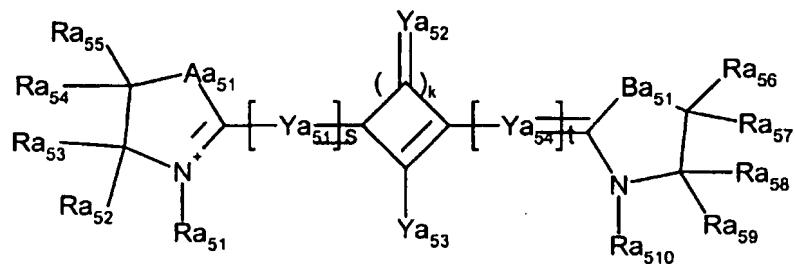
25

Der Substituent Rd<sub>49</sub> zusammen mit Rd<sub>410</sub>, und/oder der Substituent Rd<sub>48</sub> zusammen mit Rd<sub>47</sub>.

- 51 -

**Besonders bevorzugt einzusetzende Verbindungen der Formel 4d****5. Quadratsäuren**

Im Sinn der vorliegenden Erfindung bevorzugt einzusetzende Quadratsäuren sind  
5 jene der Formeln 5a, 5b und/ oder 5c



Formel 5-a

in der

- Ra<sub>51</sub> bis Ra<sub>510</sub> unabhängig voneinander für einen beliebigen Substituenten stehen können
- 5 Ya<sub>51</sub> bis Ya<sub>54</sub> unabhängig voneinander für substituiertes oder unsubstituiertes C bzw. N, wobei die Substituenten auch einen 5-oder 6-gliedrigen, aliphatischen oder aromatischen Carbo-oder Heterocyclus bilden können.
- 10 s und t unabhängig voneinander für 0,1,2 oder 3 stehen,
- k für 1 oder 2 steht,
- 15 Ya<sub>52</sub> für O,S, oder =N Ra<sub>511</sub>,
- Ya<sub>53</sub> für O-Ra<sub>512</sub>, S-Ra<sub>513</sub> oder N(Ra<sub>514</sub>)(Ra<sub>515</sub>),
- wobei Ra<sub>511</sub> bis Ra<sub>515</sub> unabhängig voneinander für einen beliebigen Substituenten stehen können
- 20 Aa<sub>51</sub> und Ba<sub>51</sub> unabhängig voneinander für O, S, Se, Te, N-Ra<sub>516</sub>, C(Ra<sub>517</sub>)(Ra<sub>518</sub>) oder -C(Ra<sub>519</sub>)=C(Ra<sub>520</sub>)-, stehen, wobei Ra<sub>516</sub> bis Ra<sub>520</sub> für einen beliebigen Substituenten, vorzugsweise für H, gegebenenfalls substituiertes Alkyl, Aryl oder Alkenyl, mit bis zu 20 C-Atomen stehen können,
- 25 mit der Maßgabe, dass mindestens einer der Substituenten Ra<sub>51</sub> bis Ra<sub>520</sub> ausgewählt ist aus der Gruppe, die gebildet wird durch -(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-SO<sub>2</sub>-Z-SO<sub>2</sub>-R, -(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-CO-Z-SO<sub>2</sub>-R, -(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-SO<sub>2</sub>-Z-CO-R, und-(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-N(R)-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>,
- 30

- 53 -

wobei

1        für eine Zahl zwischen 1 und 6,

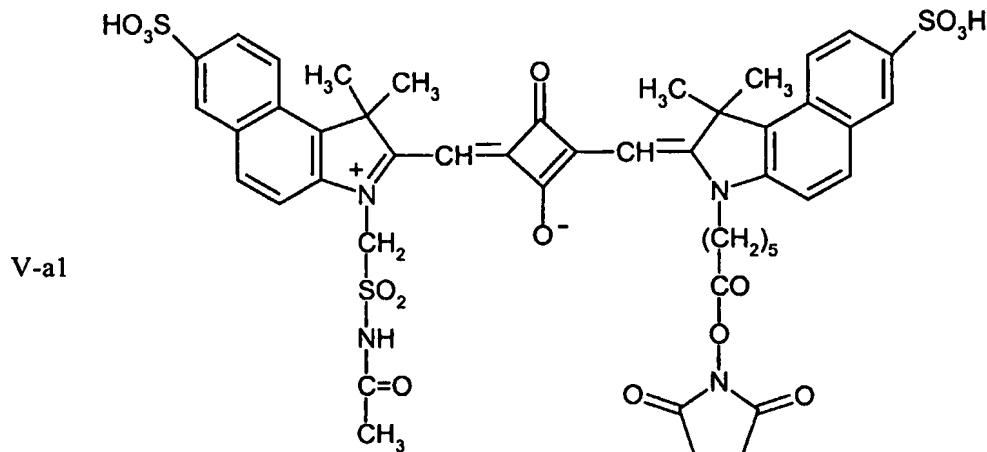
5        Z        für NH oder N<sup>-</sup> steht und

R        bevorzugt für gegebenenfalls substituiertes Alkyl oder Aryl steht.

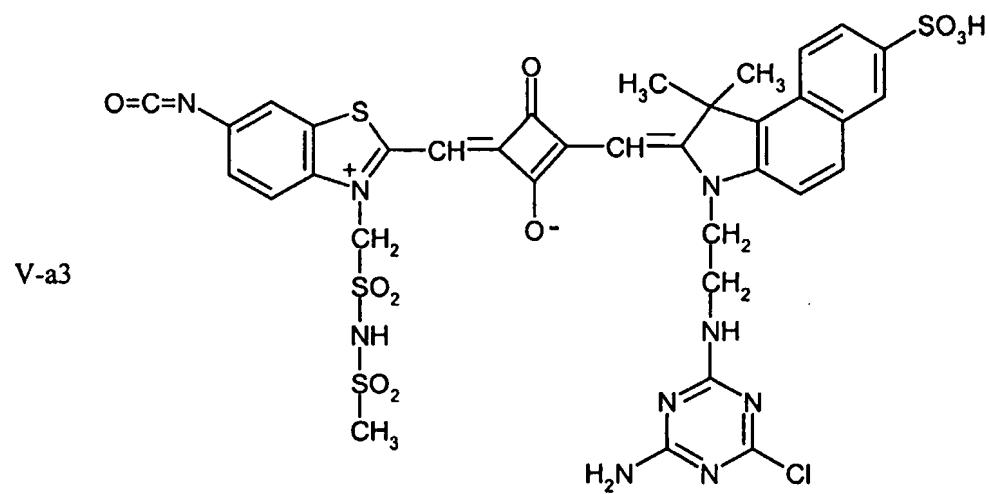
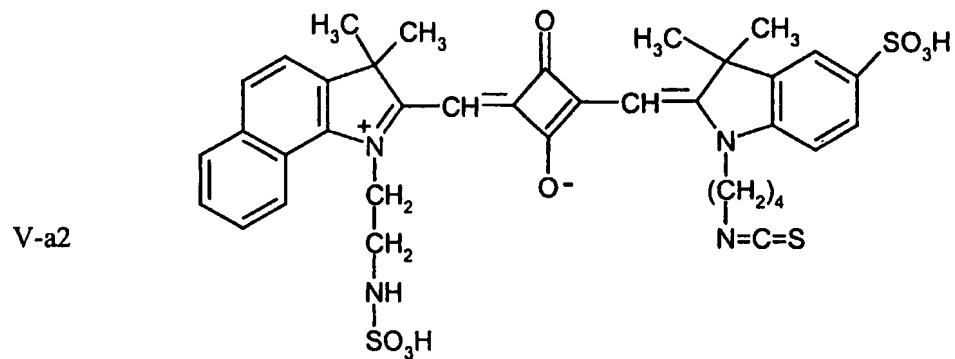
In einer bevorzugten Ausführungsform bilden die Substituenten Ra<sub>52</sub> bis Ra<sub>55</sub> bzw.  
 10      Ra<sub>56</sub> bis Ra<sub>59</sub> die restlichen Glieder eines carbo- bzw. heterocyclischen Ringsystems,  
 das bis zu 4 Ringen enthalten kann, die gegebenenfalls mehrere Substituenten tragen  
 können. Ra<sub>52</sub> kann zusammen mit Ra<sub>55</sub> und /oder Ra<sub>56</sub> zusammen mit Ra<sub>59</sub> eine π-  
 Bindung bilden und Ra<sub>53</sub> und Ra<sub>54</sub> bzw. Ra<sub>57</sub> und Ra<sub>58</sub> können Substituenten dar-  
 stellen.

15

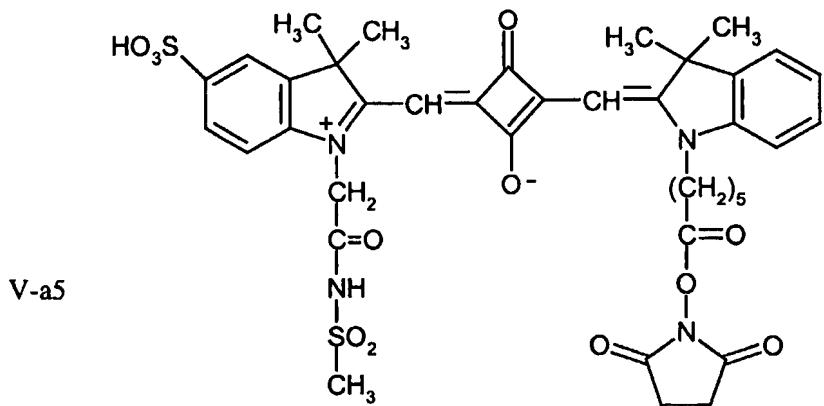
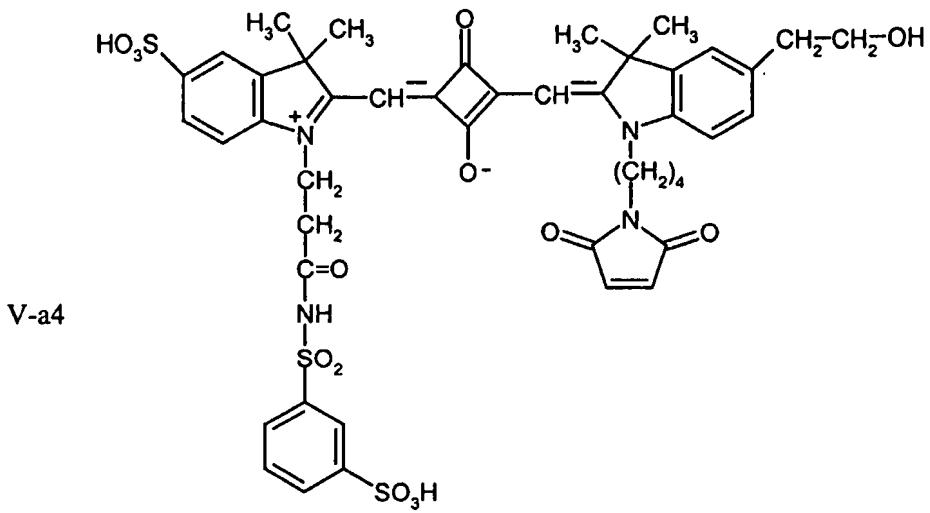
**Besonders bevorzugte Verbindungen der Formel 5a**



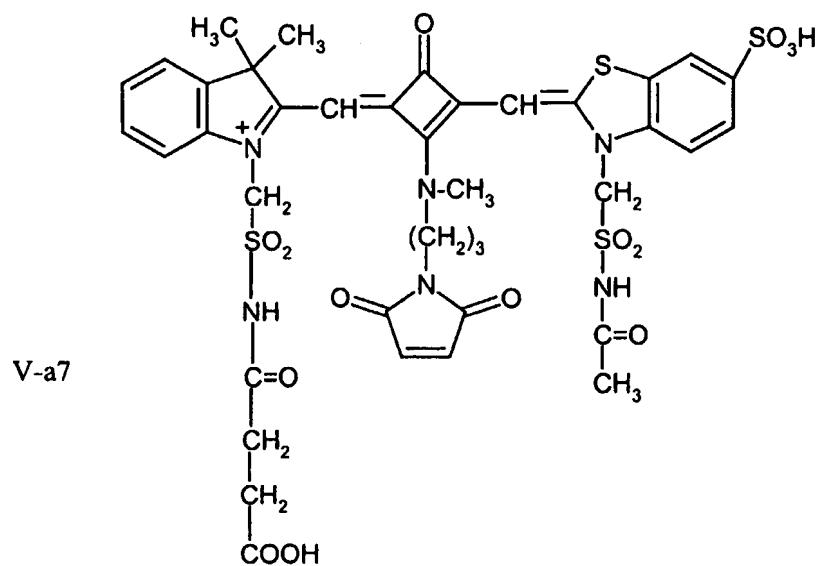
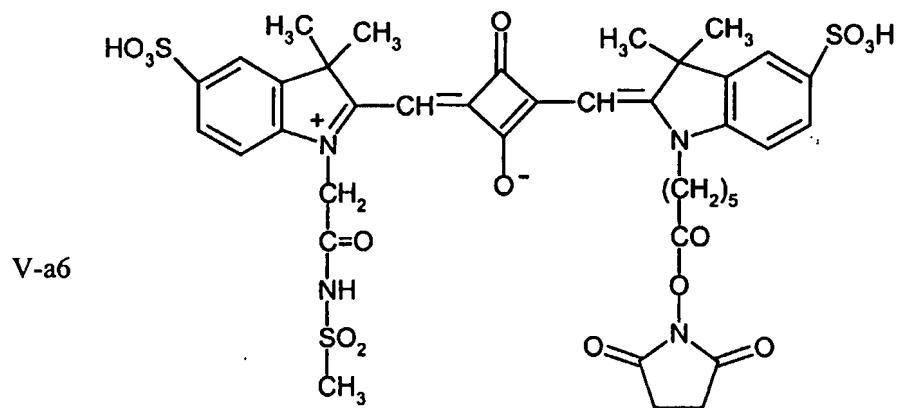
- 54 -



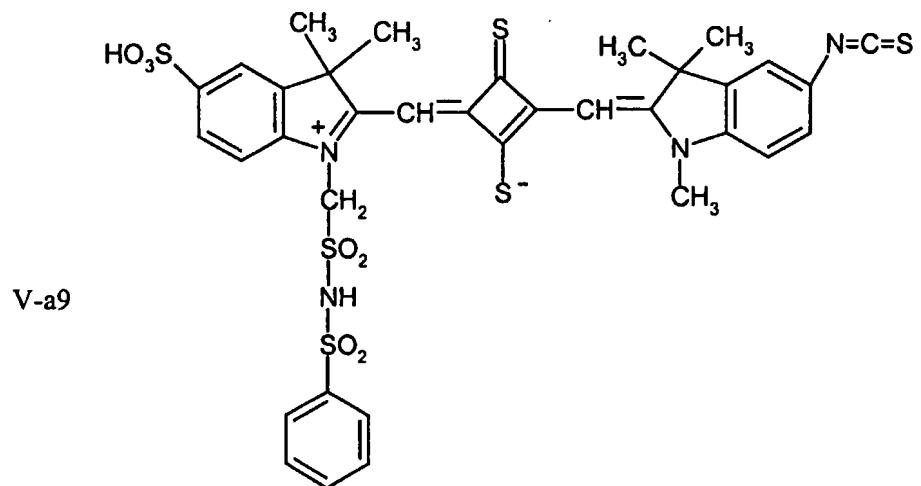
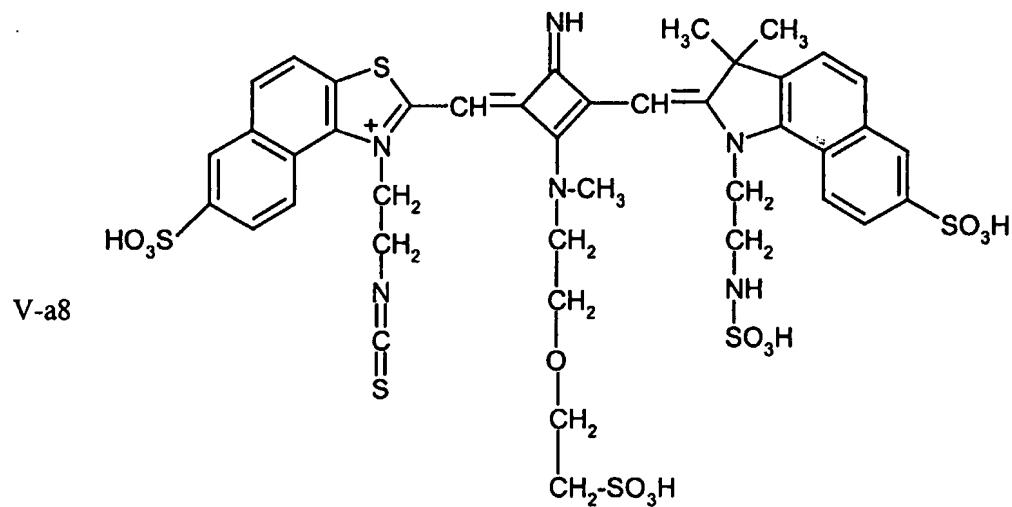
- 55 -



- 56 -

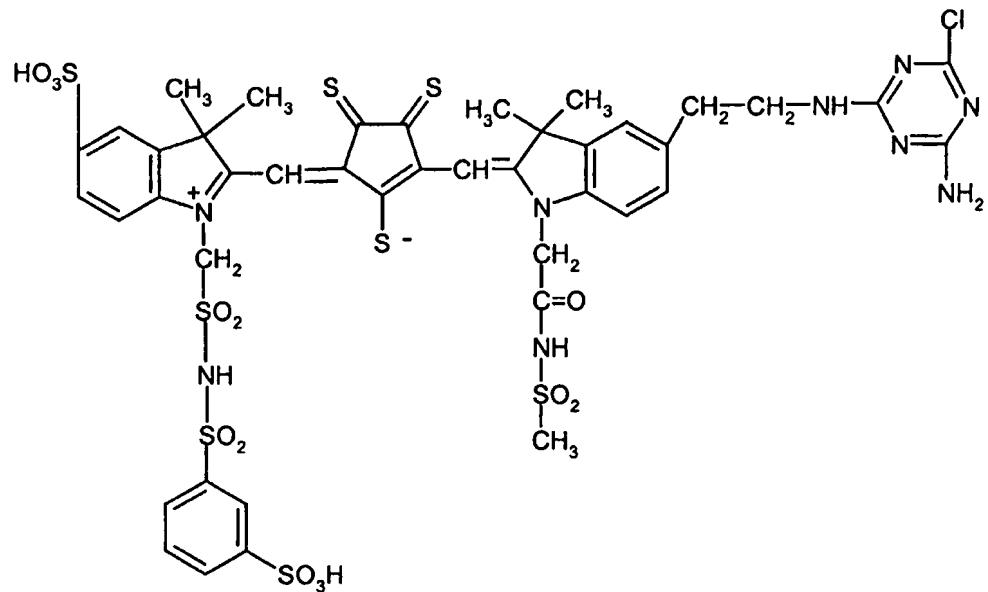


- 57 -

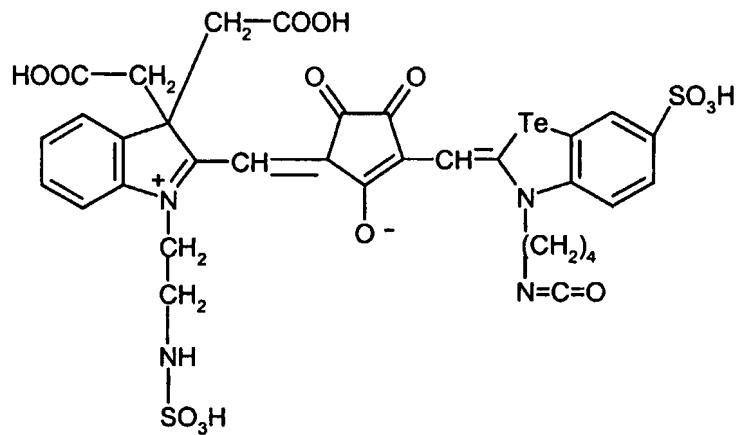


- 58 -

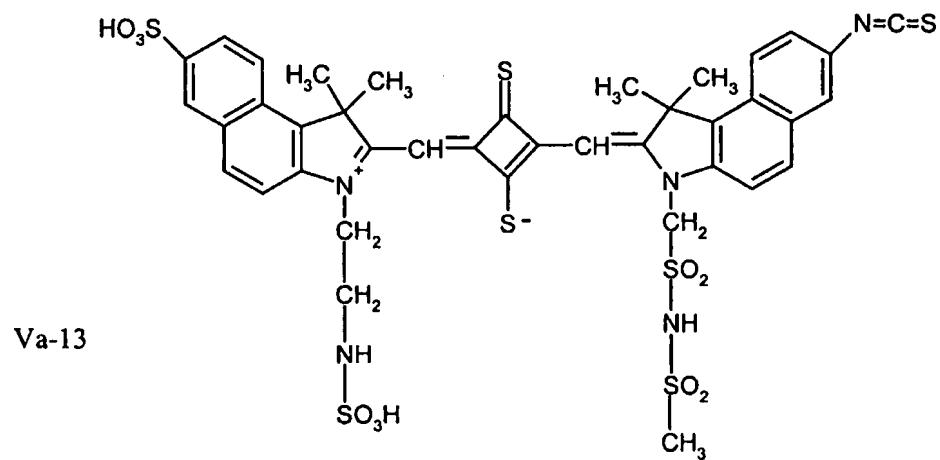
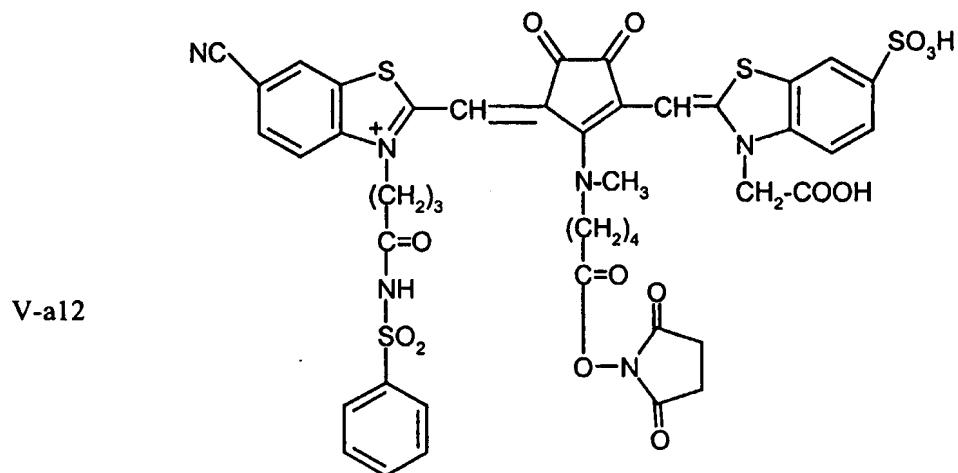
V-a10



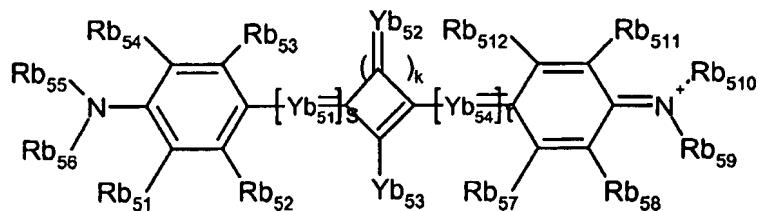
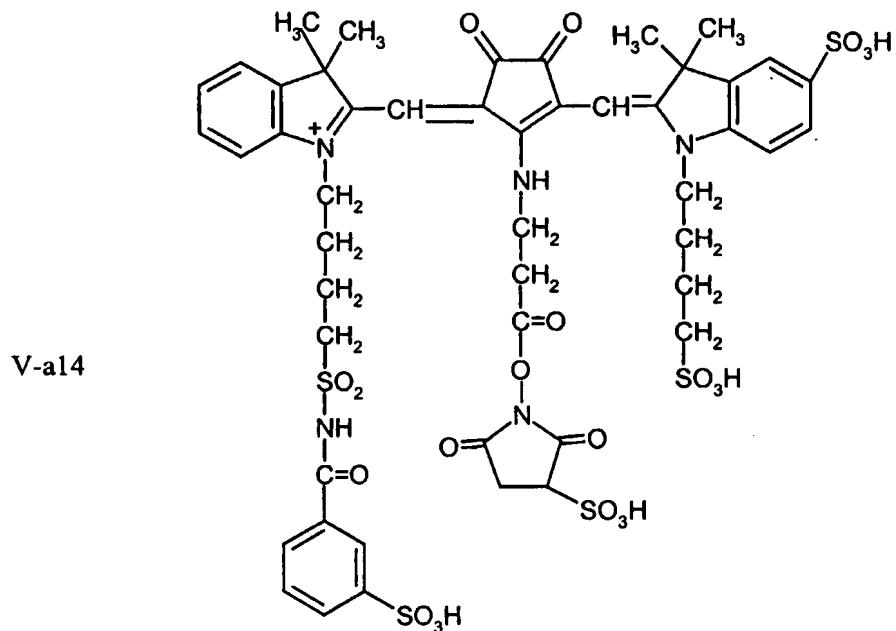
V-a11



- 59 -



- 60 -



Formel 5-b

in der

5

Rb<sub>51</sub> bis Rb<sub>512</sub> unabhängig voneinander für einen beliebigen Substituenten stehen können

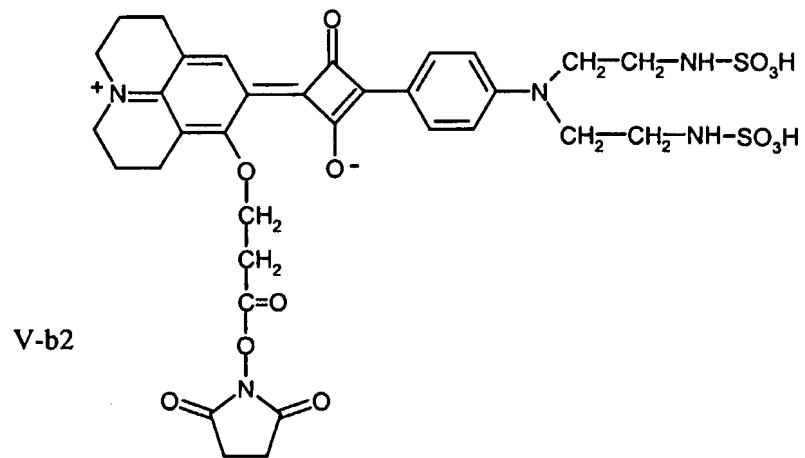
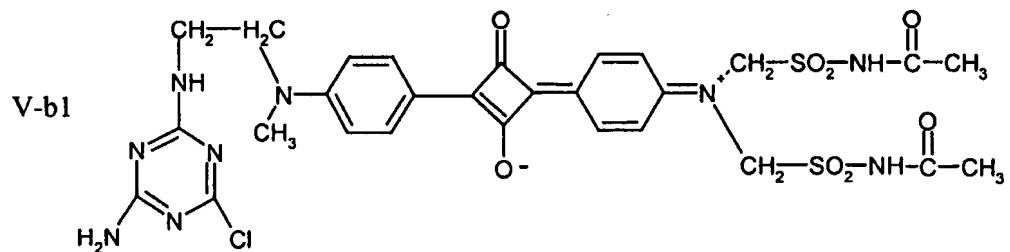
10 Yb<sub>51</sub> bis Yb<sub>54</sub> unabhängig voneinander für substituiertes oder unsubstituiertes C bzw. N, wobei die Substituenten auch einen 5-oder 6-gliedrigen, aliphatischen oder aromatischen Carbo-oder Heterocyclus bilden können.

- s und t                         unabhängig voneinander für 0,1,2 oder 3 stehen,
- k                                 für 1 oder 2 steht,
- 5
- Yb<sub>52</sub>                         für O,S, oder =NRb<sub>513</sub>,
- Yb<sub>53</sub>                         für O-Rb<sub>514</sub>, S-Rb<sub>515</sub> oder N(Rb<sub>516</sub>)(Rb<sub>517</sub>),
- 10 wobei                         Rb<sub>513</sub> bis Rb<sub>517</sub> unabhängig voneinander für einen beliebigen Substituenten stehen können,
- mit der Maßgabe, dass mindestens einer der Substituenten Rb<sub>51</sub> bis Rb<sub>517</sub> ausgewählt ist aus der Gruppe, die gebildet wird durch -(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-SO<sub>2</sub>-Z-SO<sub>2</sub>-R,  
15 -(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-CO-Z-SO<sub>2</sub>-R, -(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-SO<sub>2</sub>-Z-CO-R, und-(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-N(R)-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>,
- wobei
- 1                                 für eine Zahl zwischen 1 und 6,
- 20 Z                                 für NH oder N<sup>-</sup> steht und
- R                                 bevorzugt für gegebenenfalls substituiertes Alkyl oder Aryl steht.
- 25 In einer bevorzugten Ausführungsform können folgende Substituenten einen 5-oder 6-gliedrigen Carbo- oder Heterocyclus bilden, der gegebenenfalls auch annelliert ist: Der Substituent Rb<sub>55</sub> zusammen mit Rb<sub>56</sub> und/oder Rb<sub>55</sub> mit Rb<sub>54</sub>, und/oder Rb<sub>56</sub> mit Rb<sub>51</sub>, und/oder Rb<sub>51</sub> mit Rb<sub>52</sub> und/oder Rb<sub>54</sub> mit Rb<sub>53</sub>.

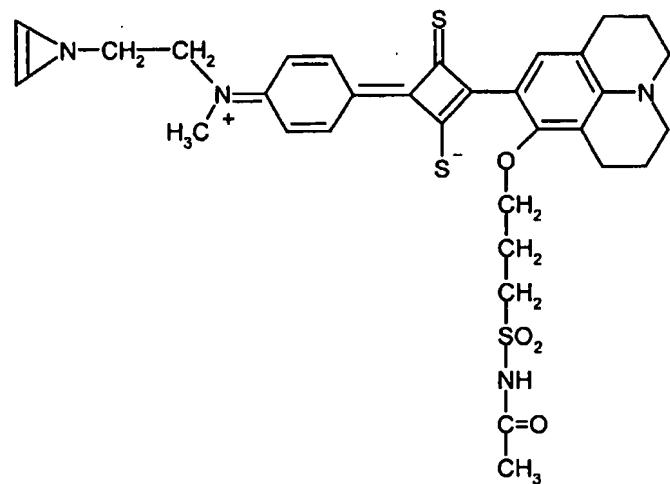
- 62 -

Der Substituent Rb<sub>59</sub> zusammen mit Rb<sub>58</sub> oder Rb<sub>510</sub> zusammen mit Rb<sub>511</sub>, der Substituent Rb<sub>511</sub> zusammen mit Rb<sub>512</sub> und/oder der Substituent Rb<sub>58</sub> zusammen mit Rb<sub>57</sub>.

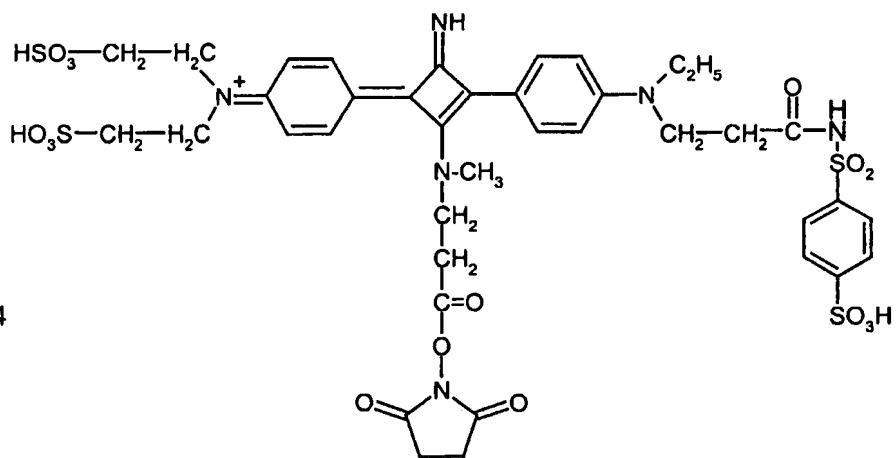
**Besonders bevorzugte Verbindungen der Formel 5b**



- 63 -

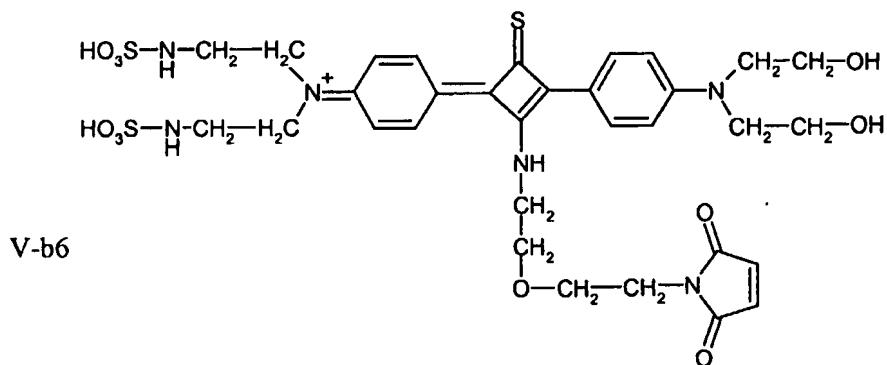
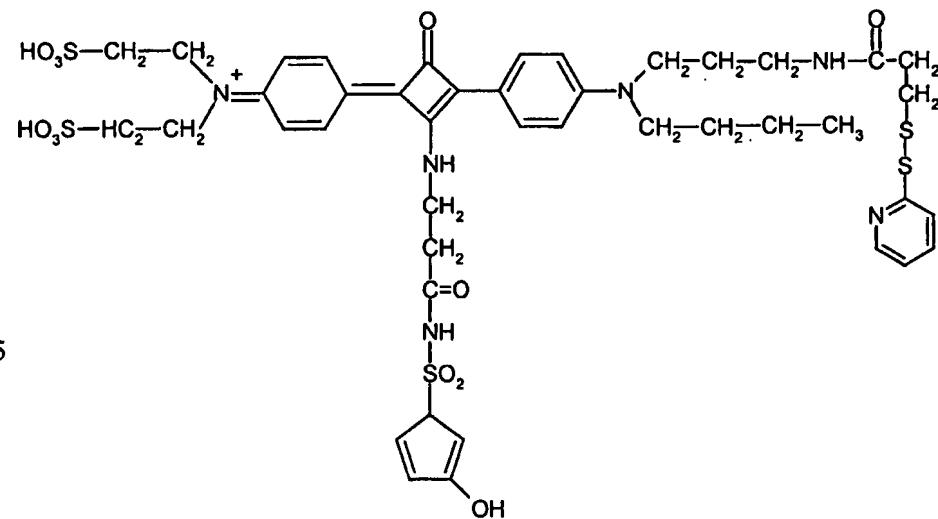


V-b3

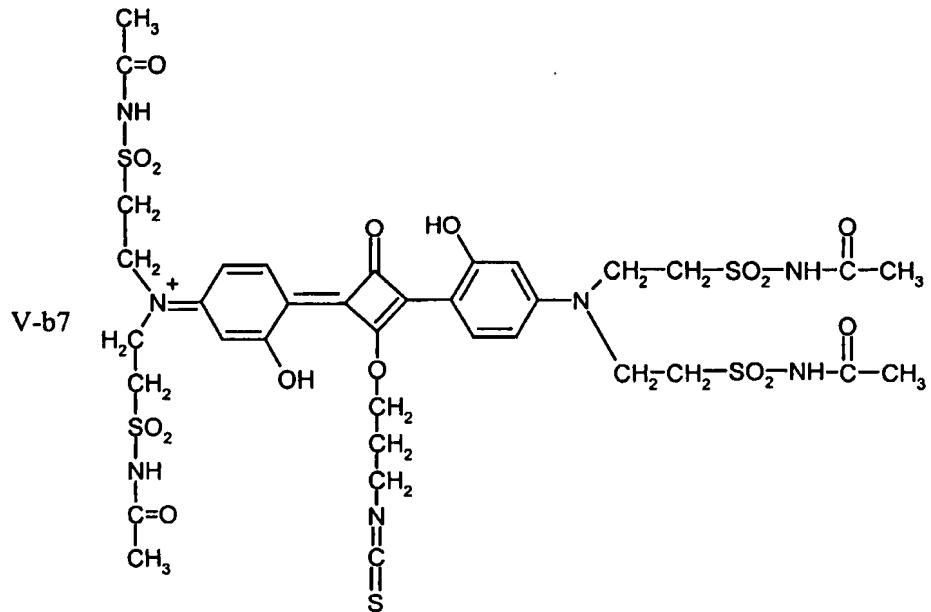


V-b4

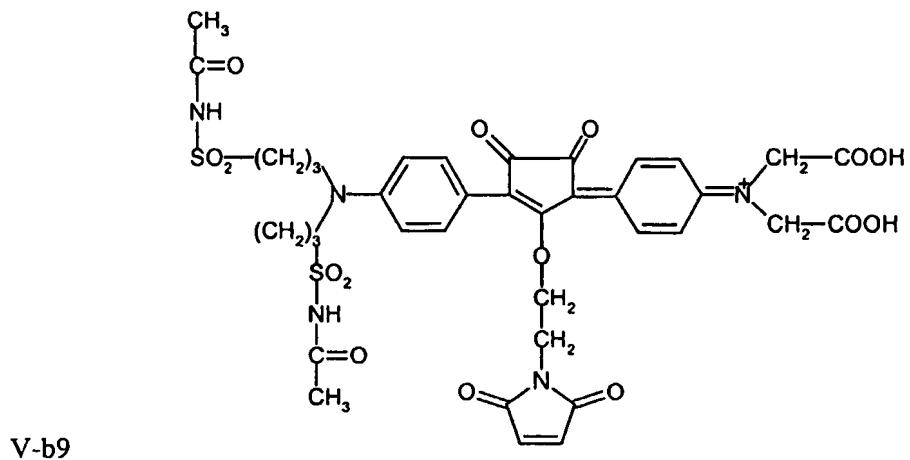
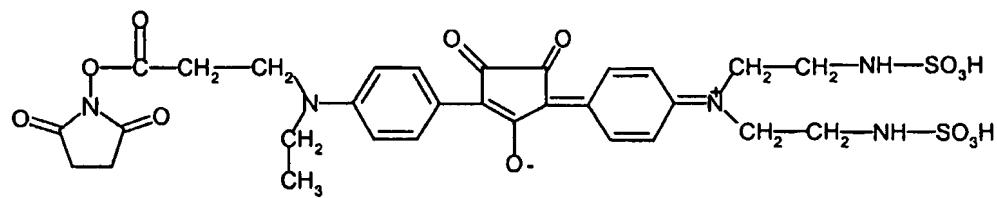
- 64 -



- 65 -

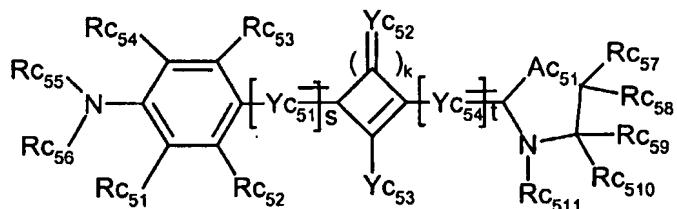
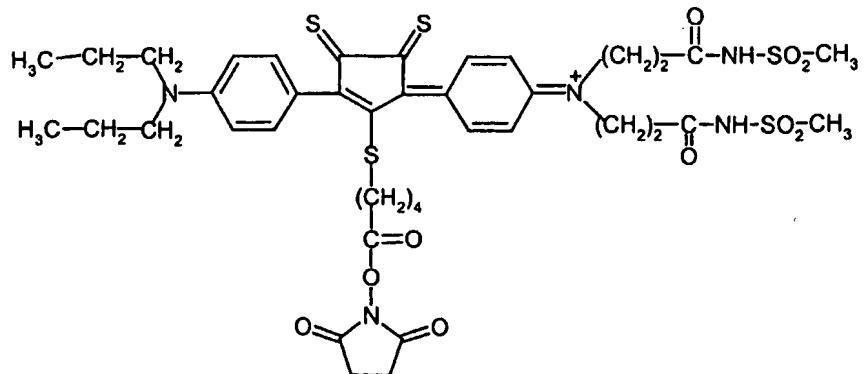


V-b8



- 66 -

V-b10



Formel 5-c

5 in der

Rc<sub>51</sub> bis Rc<sub>511</sub> unabhängig voneinander für einen beliebigen Substituenten stehen können

10 Yc<sub>51</sub> bis Yc<sub>54</sub> unabhängig voneinander für substituiertes oder unsubstituiertes C bzw. N, wobei die Substituenten auch einen 5-oder 6-gliedrigen, aliphatischen oder aromatischen Carbo-oder Heterocyclus bilden können.

15 s und t unabhängig voneinander für 0,1,2 oder 3 stehen,

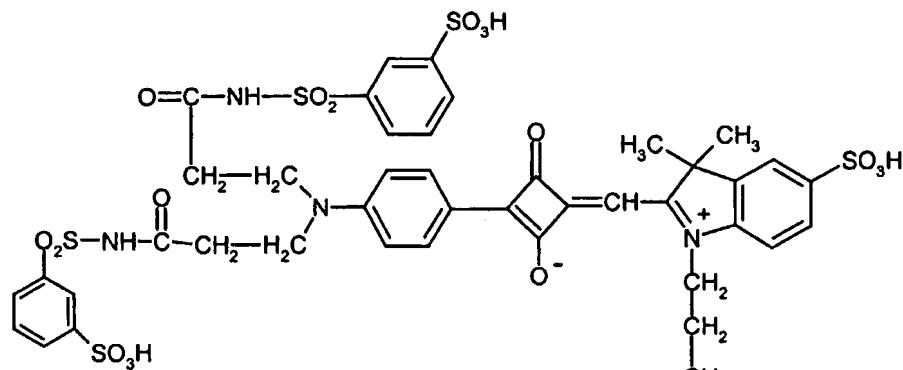
k für 1 oder 2 steht,

- Yc<sub>52</sub> für O,S, oder =NRc<sub>512</sub>,
- Yc<sub>53</sub> für O-Rc<sub>513</sub>, S-Rc<sub>514</sub> oder N(Rc<sub>515</sub>)(Rc<sub>516</sub>),
- 5 Ac<sub>51</sub> für O, S, Se, Te, N-Rc<sub>517</sub>, C(Rc<sub>518</sub>)(Rc<sub>519</sub>) oder -C(Rc<sub>520</sub>)=C(Rc<sub>521</sub>)-, steht, wobei Rc<sub>512</sub> bis Rc<sub>521</sub> für einen beliebigen Substituenten, vorzugsweise für H, gegebenenfalls substituiertes Alkyl, Aryl oder Alkenyl, mit bis zu 20 C-Atomen stehen können,
- 10 mit der Maßgabe, dass mindestens einer der Substituenten Rc<sub>51</sub> bis Rc<sub>521</sub> ausgewählt ist aus der Gruppe, die gebildet wird durch -(CH<sub>2</sub>)<sub>1</sub>-SO<sub>2</sub>-Z-SO<sub>2</sub>-R, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1</sub>-CO-Z-SO<sub>2</sub>-R, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1</sub>-SO<sub>2</sub>-Z-CO-R, und-(CH<sub>2</sub>)<sub>1</sub>-N(R)-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>,
- 15 wobei
- 1 für eine Zahl zwischen 1 und 6,
- 20 Z für NH oder N<sup>-</sup> steht und
- R bevorzugt für gegebenenfalls substituiertes Alkyl oder Aryl steht.
- In einer bevorzugten Ausführungsform können folgende Substituenten einen 5-oder 25 6gliedrigen Carbo- oder Heterocyclus bilden, der gegebenenfalls auch annelliert ist:
- Der Substituent Rc<sub>55</sub> zusammen mit Rc<sub>56</sub> und/oder Rc<sub>55</sub> mit Rc<sub>54</sub>, und/oder Rc<sub>56</sub> mit Rc<sub>51</sub>, und/oder Rc<sub>51</sub> mit Rc<sub>52</sub> und/oder Rc<sub>54</sub> mit Rc<sub>53</sub>.
- 30 Die Substituenten Rc<sub>57</sub> bis Rc<sub>510</sub> bilden vorzugsweise die restlichen Glieder eines carbo-bzw. heterocyclischen Ringsystems, das bis zu 4 Ringen enthalten kann, die

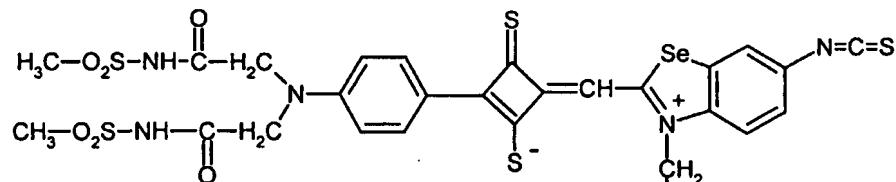
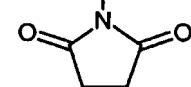
- 68 -

gegebenenfalls mehrere Substituenten tragen können. R<sub>c</sub><sub>58</sub> kann zusammen mit R<sub>c</sub><sub>59</sub> eine  $\pi$ -Bindung bilden und R<sub>c</sub><sub>57</sub> und R<sub>c</sub><sub>510</sub> können Substituenten darstellen.

**Besonders bevorzugte Verbindungen der Formel 5c**



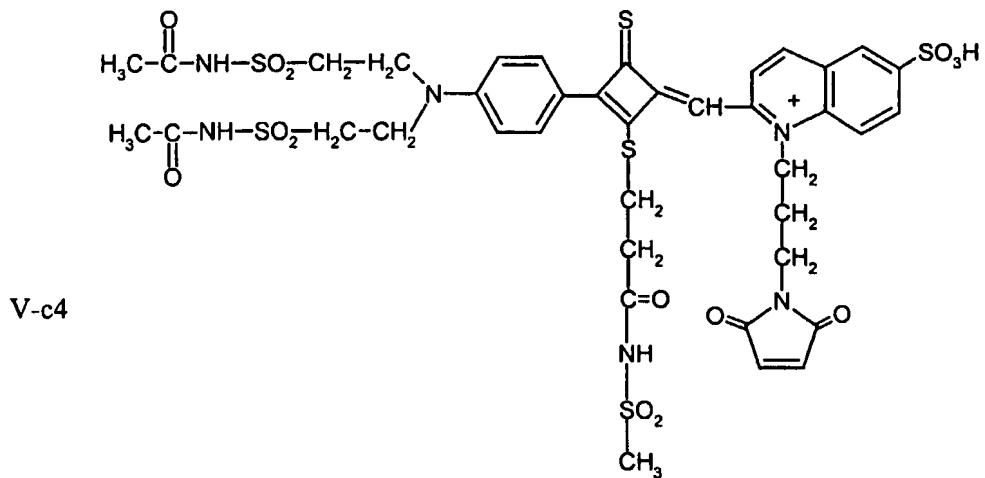
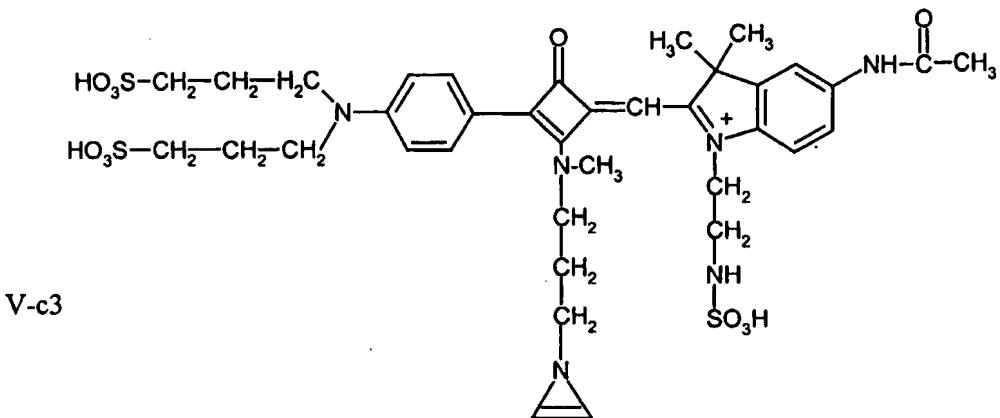
V-c1



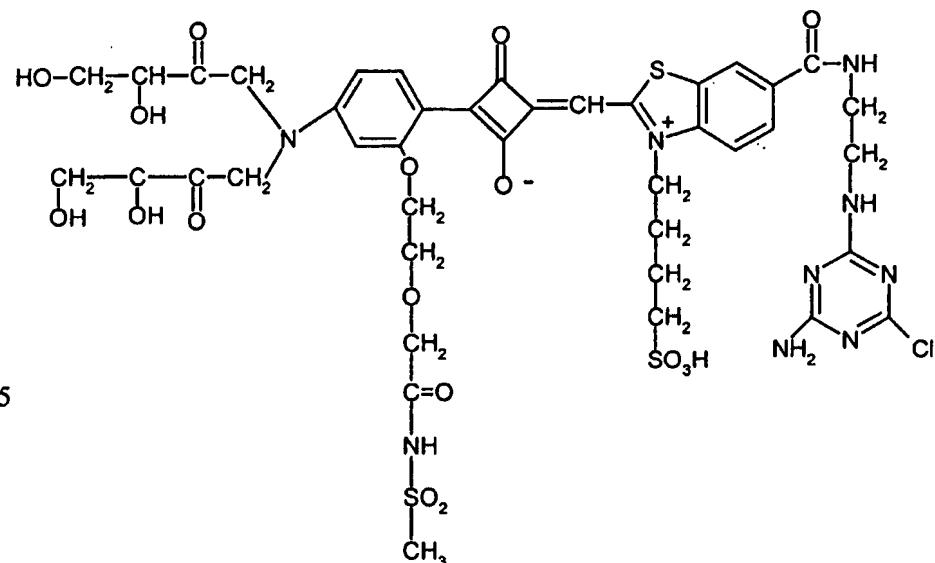
V-c2



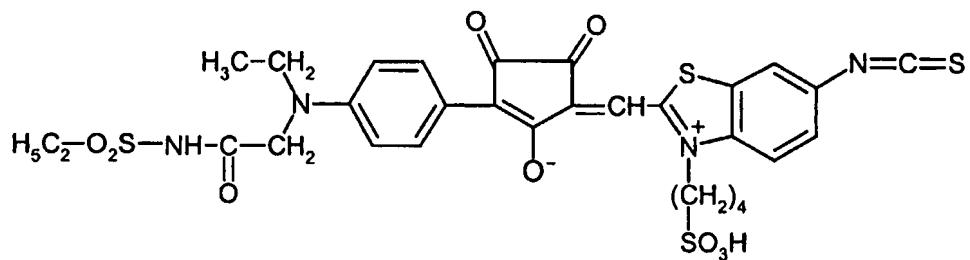
- 69 -



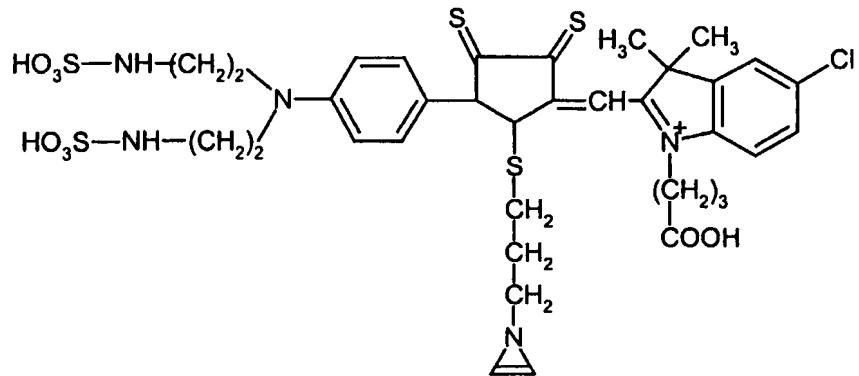
- 70 -



V-c6



V-C7



Substituenten im Sinne der vorliegenden Anmeldung sind beispielsweise Halogene, wie insbesondere F, Cl oder Br zu verstehen, desweiteren Alkoxy-, Alkylthio-, Aryloxy-, Arylthio-, Acylamino-, Alkylsulfonamido-, Alkylsulfamoyl-, Alkylcarbamoyl-, Arylsulfonamido-, Arylsulfamoyl-, Arylcarbamoyl-, Alkyl-, Alkenyl-, Aryl-,  
5 Hetaryl-, Arylen-, Hetarylen-, Alkylen-, Alkoxy carbonyl-, Ureido- oder Cyan-  
gruppen. Weiterhin bevorzugt sind substituierte sowie nicht substituierte Cyclo-  
alkyl-, und auch substituierte sowie nicht substituierte Aryl-, insbesondere Phenyl-  
gruppen besonders bevorzugte Substituenten sind gegebenenfalls substituiertes  
Alkyl, Aryl, Sulfoalkyl, Carboxyalkyl,  $-(CH_2)_1-SO_2-Z-SO_2-R$ ,  $-(CH_2)_1-CO-Z-SO_2-R$ ,  
10  $-(CH_2)_1-SO_2-Z-CO-R$ ,  $-(CH_2)_1-N(R)-SO_3^-$  wobei 1 für eine Zahl zwischen 1 und 6  
und Z für NH oder N<sup>+</sup> steht und R bevorzugt für gegebenenfalls substituiertes Alkyl  
oder Aryl steht.

Unter Alkenyl im Sinne der vorliegenden Erfindung sind lineare oder verzweigte,  
15 cyclische oder geradkettige, substituierte oder nicht substituierte ungesättigte Kohlen-  
wasserstoffreste zu verstehen wie beispielsweise Ethenyl, 2-Propenyl, Isopropenyl.

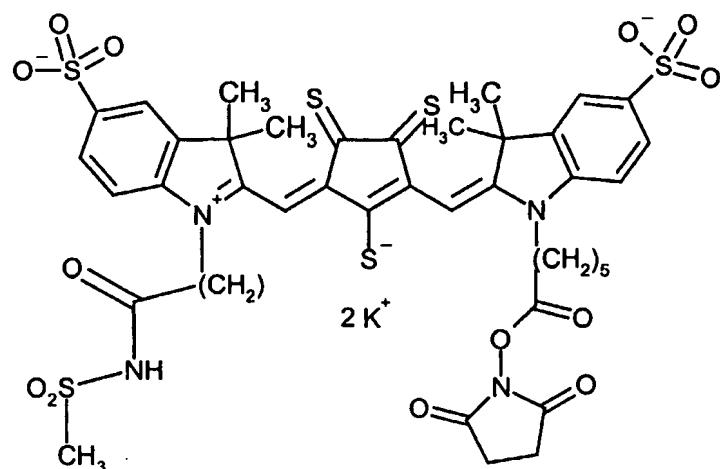
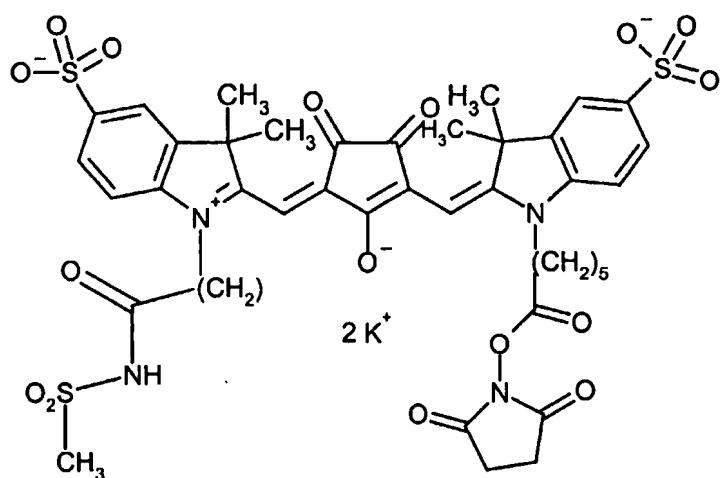
Unter carbo- bzw. heterocyclischen Ringsystemen sind im Sinne der vorliegenden  
Anmeldung sind Ringsysteme bestehend ausvorzugsweise 4,5,6,7 oder 8 Kohlen-  
stoffatomen, wobei bis zu 3 Kohlenstoffatome durch Heteroatome wie insbesondere  
20 N, O, SE, oder S ersetzt sein können. Es kann sich bei den Ringsystemen um  
aliphatische oder aromatische Ringe handeln, vorzugsweise können 2, 3 oder 4  
gleiche oder verschiedene Ringe auch als kondensiertes System vorliegen. Unter car-  
bocyclischen aromatischen Gruppen im Sinn der vorliegenden Anmeldung sind vor-  
25 zugsweise 5- oder 6-gliedrige kondensierte und/oder substituierte Ringsysteme insbe-  
sondere Phenyl- und Naphthyl zu verstehen. Unter ungesättigten heterocyclischen  
Gruppen sind vorzugsweise 5- oder 6-gliedrige Ringsysteme, welche monocyclisch  
aber auch als kondensierte Ringsysteme vorliegen können, zu verstehen. Als Hetero-  
atome kommen dabei insbesondere N, S und O in Frage. Ein Ringsystem kann vor-  
30 zugsweise zwischen 1 und 3 Heteroatome aufweisen, wobei es sich um die gleichen  
oder verschiedene Heteroatome handeln kann. Bevorzugt sind: Furyl, Indolyl,

- 72 -

Thienyl, Pyrrolyl und Carbazolyl. Diese Gruppen können unsubstituiert oder vorzugsweise substituiert sein. Dabei können auch carbocyclische aromatische Gruppen und ungesättigte heterocyclische Gruppen selber als Substituenten auftreten, darunter soll auch die mögliche Kondensation verschiedener Ringsysteme verstanden werden.

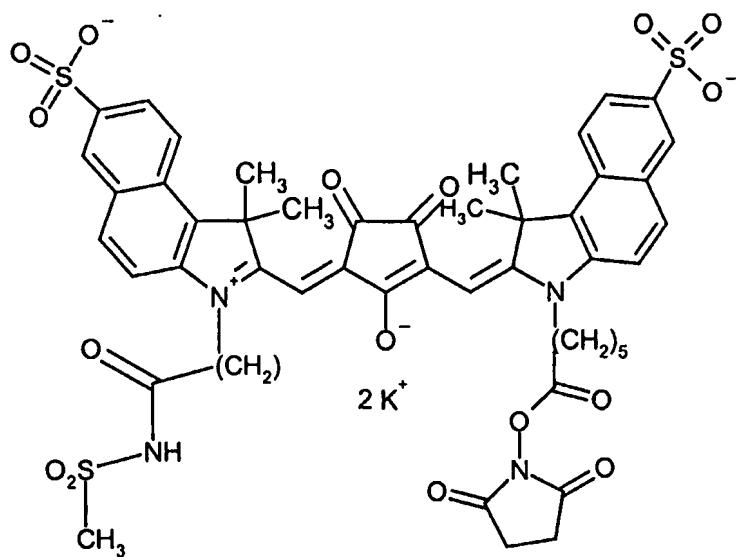
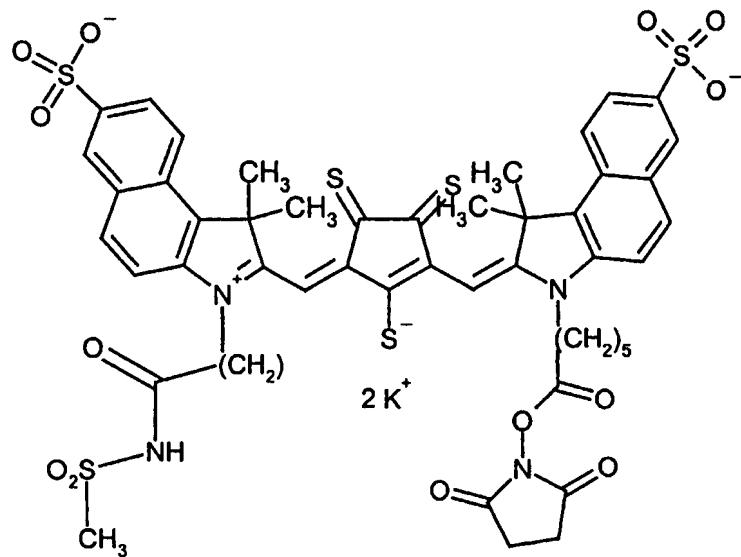
5

Erfundungsgemäß insbesondere bevorzugte Verbindungen einer der Formeln 1 bis 5 sind im folgenden aufgeführt:

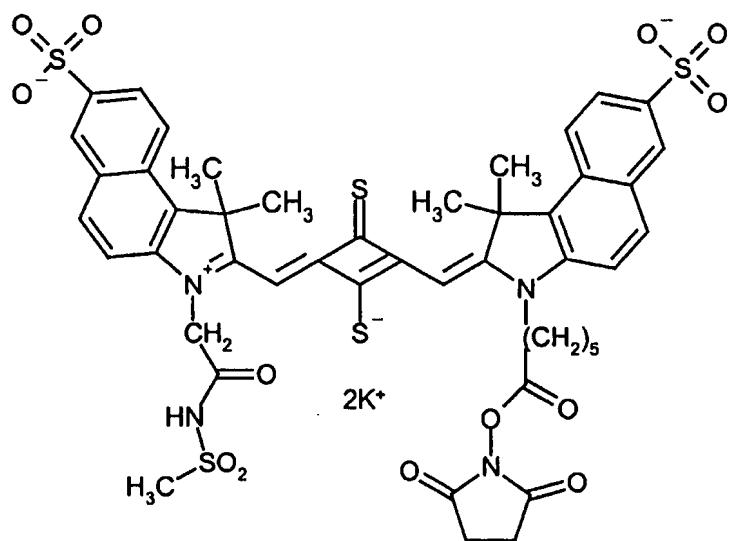
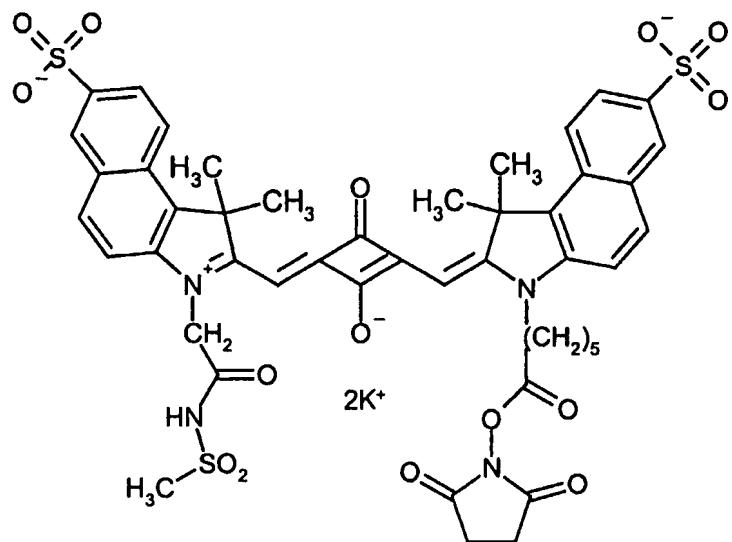


10

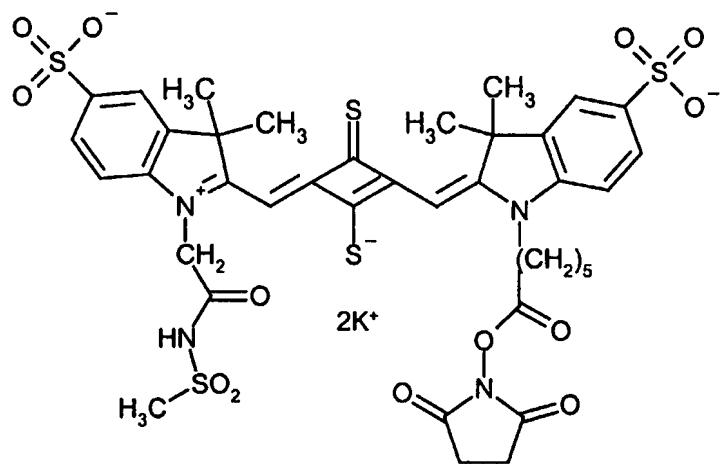
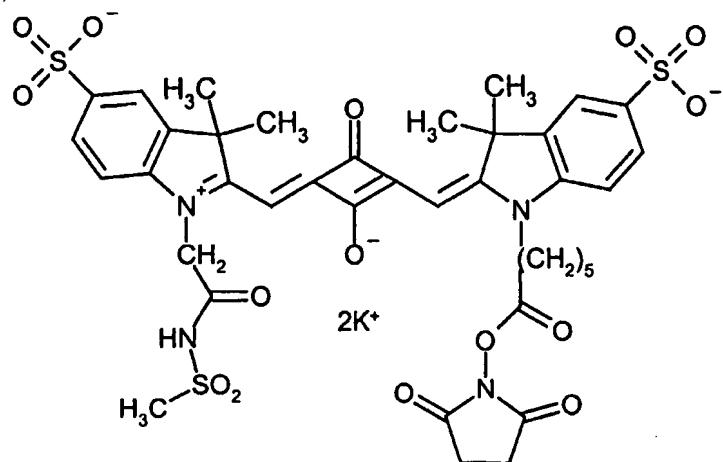
- 73 -



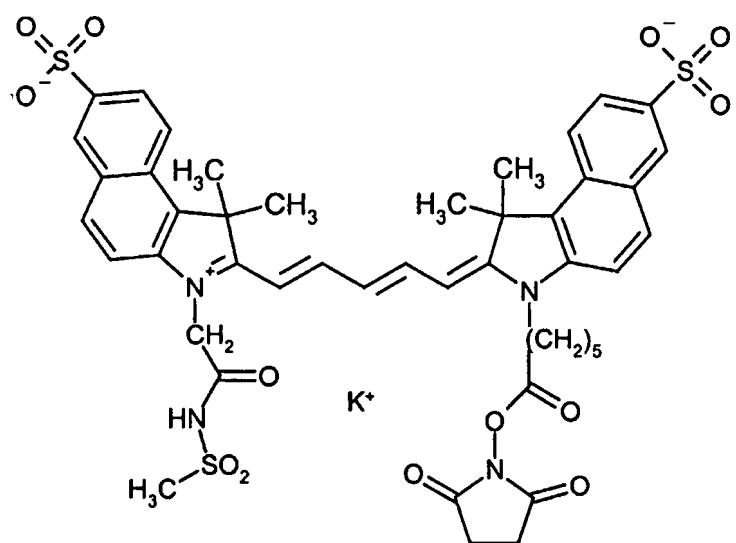
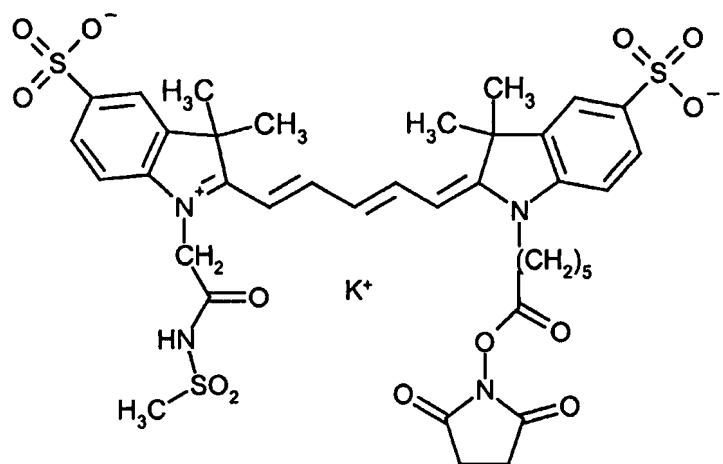
- 74 -



- 75 -



- 76 -



Erfindungsgemäß können die Farbstoffe auch an Antikörper konjugiert werden und z.B. in der Flow Cytometrie eingesetzt werden. Ein Vorteil dieser Polymethinfarbstoffe besteht darin, dass für nahezu jede Wellenlänge zwischen 500 und 900 nm ein Farbstoff maßgeschneidert werden kann. Dies führt dazu, dass auch Mehrfarbdetektion möglich ist. In der Flow Cytometrie können z.B. verschiedene Antikörper mit jeweils einem Fluoreszenzfarbstoff gelabelt werden und dann in einem Experiment mit einem geeigneten Detektionssystem simultan detektiert werden. Die spezifischen Antikörper erkennen dann verschiedene Epitope auf den Zellen. Eine Quantifizierung der Analyte ist mit diesen Systemen ebenfalls möglich. Der Einsatz mehrerer fluoreszenzgelabelter Antikörper liefert so einen höheren Informationsgehalt pro Experiment. Dies bedeutet einen Kostenvorteil, insbesondere z.B. für klinische Tests.

Desweiteren können mittels Labeling von miteinander wechselwirkenden Biomolekülen durch Fluoreszenzresonanzenergietransfer auch qualitative bzw. quantitative Nachweisverfahren durchgeführt werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung der Farbstoffe zum Labeln von DNA, RNA oder Nukleotidanaloga wie PNA und können hier für Nukleinsäureassays eingesetzt werden können. Üblicherweise werden hier aktivierte Farbstoffmoleküle an Nukleotide, Nukleoside, Nukleotidanaloga oder Oligonukleotide bzw. deren Analoga gebunden. Die Bindung erfolgt über eine nukleophile Gruppe der Nukleotide bzw. Analoga, welche mit dem aktivierten Farbstoff reagiert. Übliche nukleophile Gruppen sind Aminogruppen, Thiolgruppen, Hydroxylgruppen oder andere Gruppen. Die aktivierte Gruppen sind in der Regel Derivate von Carboxylgruppen, wie N-Hydroxysuccinimidester, Isothiocyanate, Maleimide oder Iodacetamidderivate. Außerdem kann eine nukleophile Gruppe auch mit einem Phosphoamiditrest reagieren und so eine kovalente Bindung zwischen dem Farbstoffmolekül und dem Biomolekül entstehen.

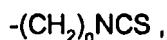
Als weitere Anwendung können die Farbstoffe auch an feste Phasen, wie z.B. polymeren Beads gebunden werden oder in diese eingelagert werden. Die polymeren

Beads können funktionalisiert werden und ihrerseits als Fluoreszenzlabel in der Bioanalytik fungieren.

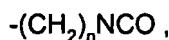
Wie bereits beschrieben sind Polymethinfarbstoffe enthaltend eine Gruppe der Formel (I) bereits aus der Fotografie bekannt, sie sind erhältlich wie beispielsweise in EP 0 534 283, EP 0 530 511, DE 1 081 311 beschrieben.

Demgegenüber sind Polymethinfarbstoffe enthaltend eine Gruppe der Formel (I) und gleichzeitig eine Gruppe die sie befähigt kovalente Bindungen auszubilden, ausgewählt aus der Gruppe der folgenden Verbindungen:

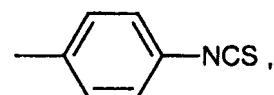
(a)



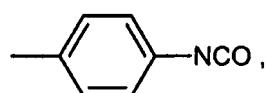
(b)



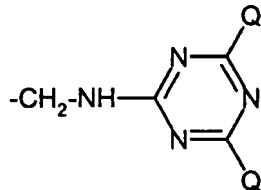
(c)



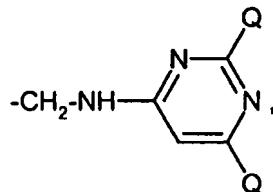
(d)



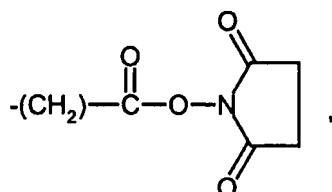
(e)



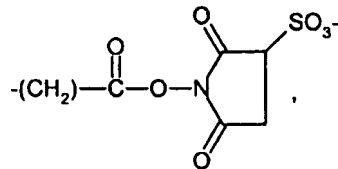
(f)



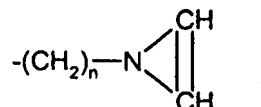
(g)



(h)

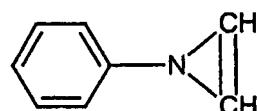


(i)

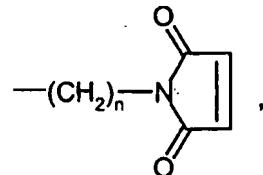


- 79 -

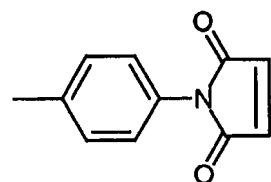
(j)



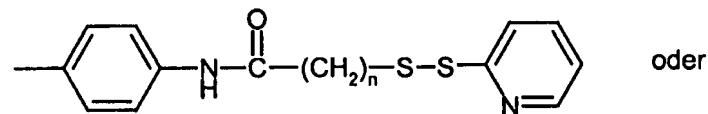
(k)



(l)

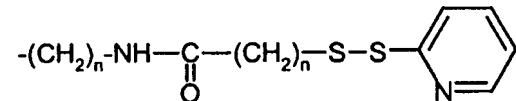


(m)



oder

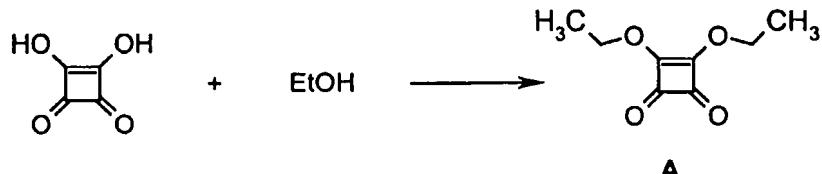
(n)



neu und im Stand der Technik noch nicht beschrieben. Im folgenden sind daher Synthesevorschriften aufgezeigt, wie derartig „aktivierte“ Farbstoffe erhalten werden können:

5      Synthesevorschriften für die Herstellung von erfindungsgemäßen Farbstoffen F und J

#### 1. Synthese von F



- 80 -

A

0,15 mol 3,4-Dihydroxy-3-cyclobuten-1,2-dion wird 12 h in 150 mL absolutem Ethanol unter Rückfluss erhitzt.

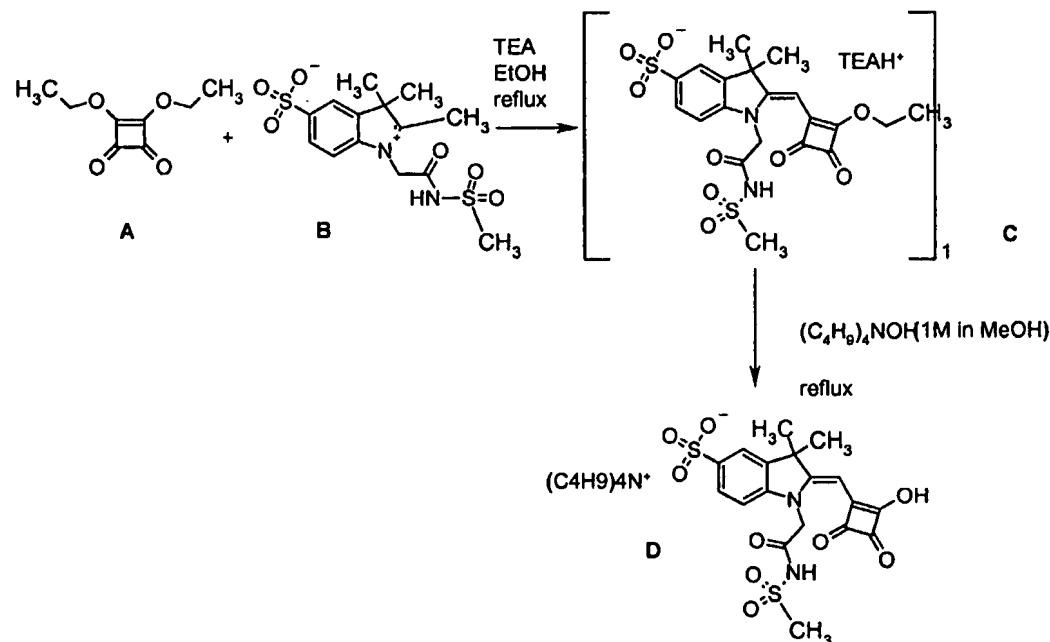
Das Reaktionsgemisch wird eingedampft.

5 Die Reinigung des Öls erfolgt durch Säulenchromatografie.

Eluent: Methyl-tert.-butylether/iso-Octan 50:50

Stationäre Phase: AMICON 35-70 mic.

Ausbeute: 48%



10

C

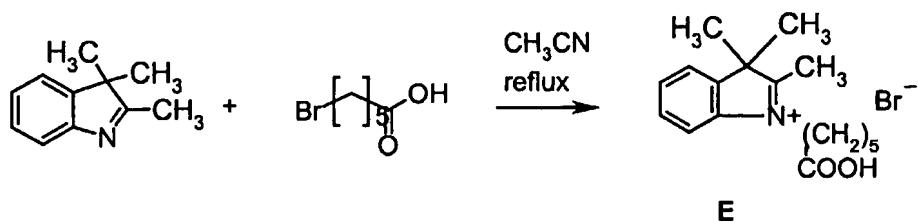
0,055 mol A , 0,0068 mol B und 0,0078 mol Triethylamin werden in 50 mL absolutem Ethanol am Rückfluss gekocht. Nach 35 min. wird 0,107 mol 15 Triethylamin zugegeben. Nach 3,5 h kühlt man ab. Man gibt Ethylacetat zu und dekantiert nach kräftigem Rühren. Diese Verfahrensschritte werden noch 3mal wiederholt. Man gewinnt ein Öl (C).

- 81 -

Hydrolyse zu D

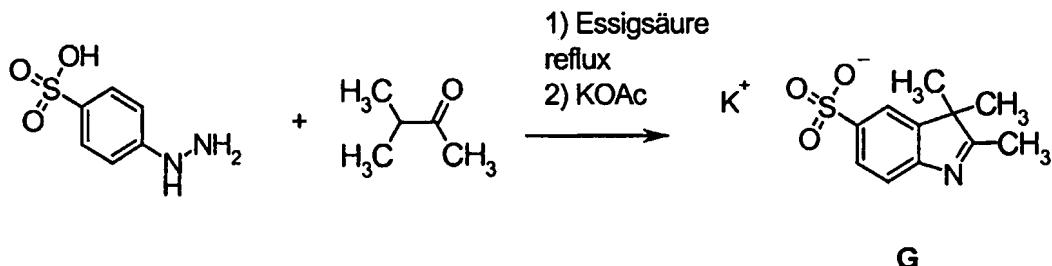
Das Öl C wird in 0,145 mol  $(C_4H_9)_4NOH$  (1 M in Methanol) unter Rückfluss erhitzt. Nach 30 min kühlt man ab. 500 mL Aceton und 16 mL konzentriertes HCl werden zugegeben. Man filtriert den ausgefallenen Feststoff ab.

5 Ausbeute: 28 g

E

10 0,63 mol 2,3,3-Trimethylindolenin und 0,5 mol  $Br(CH_2)_5COOH$  werden 3 h in einer geringen Menge Acetonitril unter Rückfluss erhitzt. Die Temperatur des Reaktionsgemisches beträgt 130°C. Man gibt 0,5 mol Essigsäure zu und kühlt auf 100°C ab. Anschließend gibt man 250 mL Methylethylketon zu und kühlt weiter im Eisbad auf 15°C ab. Man filtriert den ausgefallenen Feststoff ab und trocknet bei 50°C.

15 Ausbeute: 75%

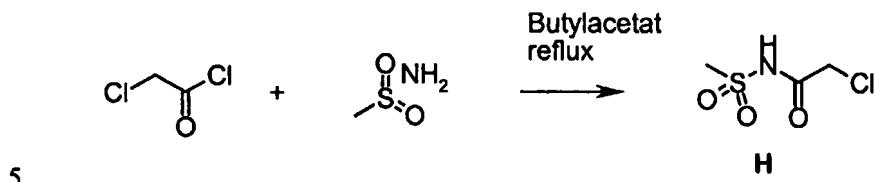
G

20 3,5 mol Phenylhydrazin-4-sulfonic acid und 1,9 L Essigsäure werden auf 105°C erhitzt. Im Verlauf von 30 min tropft man 4,8 mol 3-Methyl-2-butanon zu. Nach 1 h 50 min entfernt man die Heizquelle und gibt man 4,2 mol Kaliumacetat in 3,5 L

- 82 -

Methanol zu. Man kühlt weiter im Eisbad ab und filtriert den ausgefallenen Feststoff ab. Mit Ethylacetat wird nachgewaschen.

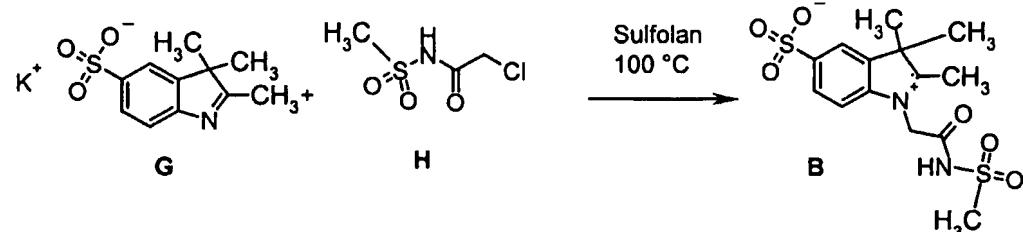
Ausbeute: 77%



26,8 mol Chloracetylchlorid und 25,5 mol Methansulfonamid werden in 10,2 L Butylacetat langsam am Rückfluss gekocht. Nach 8 h kühlt man auf 20°C ab. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert und in 4 L Butylacetat gerührt. Der ausgefallene Feststoff wird bei 50°C im Umlufttrockenschrank getrocknet.

10

Ausbeute: 74%



15

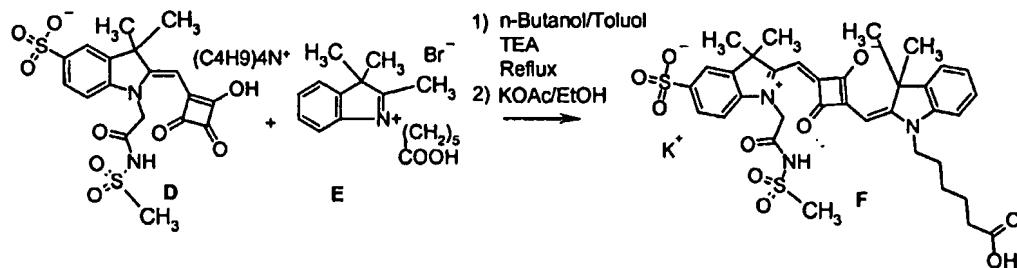
**B**

2,5 mol **G** und 2,5 mol **H** werden in 1,3 L Sulfolan auf 130°C erwärmt. Nach 5 h und 50 min kühlt man auf 50°C ab. Man gibt 2,5 L Aceton zu und kühlt weiter bis auf Raumtemperatur. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert und mit Aceton nachgewaschen. Man röhrt den ausgefallenen Feststoff in 1,6 L warmem entmineralisiertem Wasser. Man gibt 1,6 L Ethanol zu und kühlt ab. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert und mit Ethanol nachgewaschen.

20

Ausbeute: 53%

- 83 -

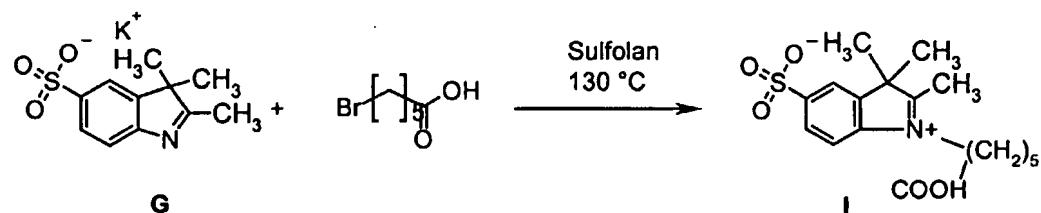


### F

In einem Kolben mit Dean-Stark-Abscheider werden 4,7 g D, 3,5 g E und 1,4 mL Triethylamin in n-Butanol/Toluol am Rückfluss gekocht. Nach 2,5 h kühlt man ab. Man extrahiert 3 mal mit Wasser. Das Reaktionsgemisch wird eingedampft und danach erneut in Ethanol gelöst. Man gibt 3 g Kaliumacetat zu und filtriert ab. Man nimmt den ausgefallenen Feststoff in Wasser auf und gibt Aceton zu. Man dekantiert und gibt erneut Aceton zu. Diese Verfahrensschritte werden wiederholt, bis Ausfällung auftritt. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert.

10

### 2. Synthese von J

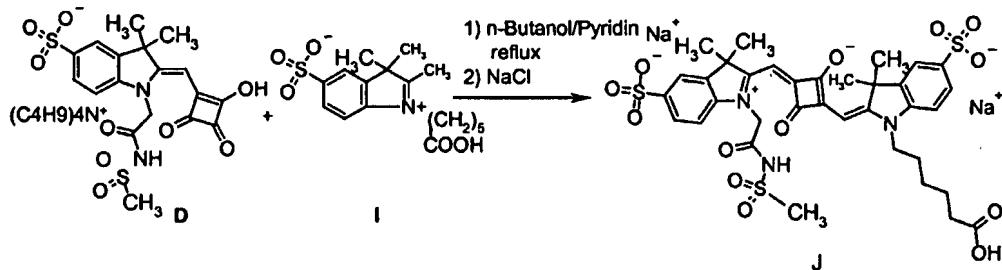


15

### I

0,1 mol G und 0,12 mol  $\text{Br}(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$  werden in 35 mL Sulfolan auf 130°C erwärmt. Nach 3 h gibt man 100 mL Dimethylacetamid zu und kühlt auf Raumtemperatur ab. Man filtriert den ausgefallenen Feststoff ab und wäscht auf dem Filter mit Dimethylacetamid nach. Man kocht den ausgefallenen Feststoff in Aceton. Nach dem Abkühlen filtriert man und trocknet im Umlufttrockenschrank bei 50 °C. Ausbeute: 90%

- 84 -



### J

4,7 g D und 3,5 g I werden 2 h und 10 min in 80 mL n-Butanol/Pyridin (7:1) am Rückfluss gekocht. Man kühlt auf Raumtemperatur ab und filtert den ausgefallenen Feststoff ab. Auf dem Filter wird mit n-Butanol bzw. Aceton nachgewaschen. Man nimmt den ausgefallenen Feststoff in 7 mL entmineralisiertem Wasser auf und gibt unter Rühren 30 mL Acetonitril zu. Man dekantiert die flüssige Phase und gibt unter Rühren abermals Acetonitril zu. Man dekantiert die flüssige Phase und röhrt das Öl mit 40 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung. Die feine Suspension wird zentrifugiert und die flüssige Phase dekantiert. Man löst den ausgefallenen Feststoff in Methanol und filtert das Natriumchlorid ab. Das Filtrat wird eingedampft. Man trocknet bei 50°C

Ausbeute: 1,57 g (18,5%)

15

Allgemeine Vorschrift zur Herstellung von Succinimidylestern aus Polymethinfarbstoffen mit Carboylfunktionen

20 Die vorliegende Vorschrift beschreibt die Herstellung von Succinimidylestern aus Polymethinfarbstoffen mit mindestens einer Carboxylfunktion. Diese Ester können dann zum Labeln von Biomolekülen wie Proteinen, Antikörpern oder Nukleinsäuren benutzt werden.

25 0.05 mmol Farbstoff werden mit Disuccinimidylcarbonat (1.5 Equivalente pro Carboxylgruppe) in 40mL DMF gelöst und eine Spatelspitze Dimethylaminopyridin

zugegeben. 3 Std. wird bei 40°C gerührt. Nach Abkühlen wird der Überstand in 1 ml Aliquots auf Glasvials verteilt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abgedampft und bis zur Verwendung im Dunkeln bei 4°C gelagert.

- 5      Das Rohprodukt wird direkt zum Labeln von Proteinen benutzt.

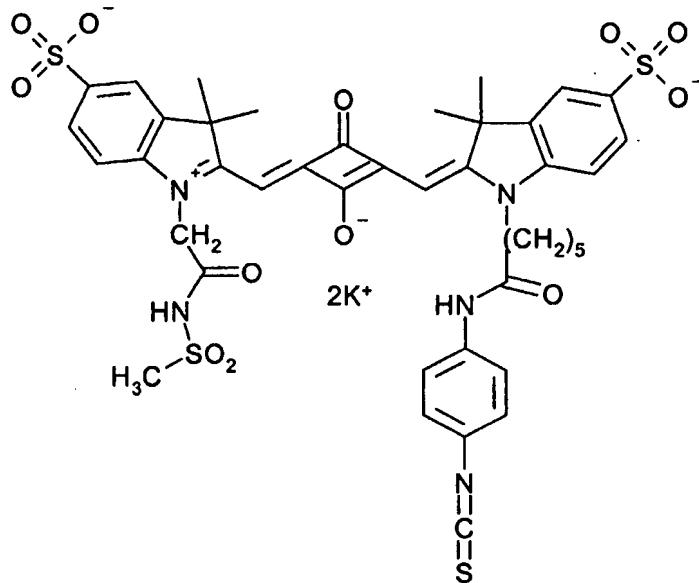
Allgemeine Vorschrift zum Labeln von Proteinen

Zum Labeln wird das Rohprodukt (1 Aliquot) in 1 ml DMF gelöst. 50 µl dieser  
10     Lösung werden zu 1,5 mL (=1mg) Anti-HSA- Lösung in 0.1 M Carbonatpuffer pH  
9.2 pipettiert. Die Reaktionslösung wird 2 Stunden bei RT gerührt.

Anschließend trennt man das Konjugat vom ungebundenen Farbstoff mittels Gelper-  
15     meationschromatographie über eine Sephadex G50 Säule ab, die zuvor mit PBS,  
pH 7.4 equilibriert wurde.

Allgemeine Vorschrift zum Labeln von Oligonukleotiden mit Farbstoff

Die Farbstoffe können auch für das Markieren von DNA oder RNA-Nukleotiden  
20     oder Nukleotidanaloga eingesetzt werden.



Farbstoff K

50 mmol aktivierter Farbstoff, z.B. Isothiocyanat K werden in 50 ml DMF oder  
 5 Acetonitril gelöst. 10 nmol NH<sub>2</sub>-Oligonukleotid werden in 150  $\mu$ l 50 mM Carbonat-  
 puffer, pH 9.2 vorgelegt und langsam 75 nmol Farbstoff hinzupipettiert. Die Lösung  
 wurde 3 bis 5 Std. bei 25°C gerührt unter Lichtausschluss.

#### Aufreinigung des Oligonukleotids

10

Die Reinigung des gelabelten Oligonukleotids von ungebundenem Farbstoff und un-  
 gelabelter DNA erfolgte über RP-HPLC über eine C8-Säule. Es wurde mit einem  
 linearen Gradienten, z.B. von 70 % Wasser bis 100 % Methanol über 30 min. eluiert.

15

Die Fraktionen, die bei 254 nm und dem Absorptionsmaximum des Farbstoffs  
 gleichzeitig absorbieren wurden gesammelt und im Vacuum vom Lösungsmittel ent-  
 fernt.

20

Zur weiteren Verwendung des modifizierten Oligonukleotids kann dieses noch durch  
 Ethanolpräzipitation von überschüssigen Salzen getrennt werden.

**Beispiele**

Tabelle 1 zeigt die relativen Quantenausbeuten der Farbstoffe bei ähnlichen molaren Farbstoff/Protein-Verhältnissen. Als Protein wurde HSA (Human Serum Albumin) verwendet.

Farbstoff	D/P Ratio	rel. Q.Y.	Extinktionskoeffizient [mol <sup>-1</sup> *cm <sup>2</sup> ]
Sq-1 (Bsp.)	0.36	0.64	172000
Sq-2 (Bsp.)	0.40	1.0	234000
F (Inv.)	0.37	1.35	420000
J (Inv.)	0.46	1.36	240000

Tabelle 1

**Bestimmung des molaren Farbstoff/Proteinkoeffizienten**

Die Proteinkonzentration wird mittels der BCA-Methode von Pierce (Literatur: Bradford, M.M.; Anal. Biochem. (1976) 72, 248-254) bestimmt. Eine Eichkurve für anti-HSA wurde zuvor erstellt.

Die Farbstoffkonzentration wird über das Absorptionsspektrum bestimmt.

15

**Bestimmung der Quantenausbeute**

Die Bestimmung der Quantenausbeute erfolgt relativ zu Cy5

**Bestimmung des Extinktionskoeffizienten**

Der Extinktionskoeffizient wurde unter Annahme der Gültigkeit des Beer'schen Gesetzes bestimmt.

Labeln von aktiviertem Farbstoff F an Anti-HSA

Zum Labeln wird das Rohprodukt (1 Aliquot) in 1 ml DMF gelöst. 50 µl dieser Lösung werden zu 1,5 mL (=1mg) Anti-HSA- Lösung in Carbonatpuffer pH 9.2 pipettiert. Die Reaktionslösung wird 2 Stunden bei RT unter Lichtausschluss gerührt.

5

Anschließend trennt man das Konjugat vom ungebundenen Farbstoff mittels Gelpermeationschromatographie über eine Sephadex G25 Säule ab. Als Elutionspuffer wird PBS, pH 7.4 benutzt.

10

In analoger Weise wurden Proteinkonjugate von den anderen Farbstoffen, die in Tabelle 1 angegeben sind, hergestellt.

15

Tabelle 1 zeigt, dass die erfindungsgemäßen Farbstoffe höhere Quantenausbeuten und Extinktionskoeffizienten aufweisen als z.B. Cy5. Daher sind sie besonders geeignet als Fluoreszenzmarkierer in der Bioanalytik.

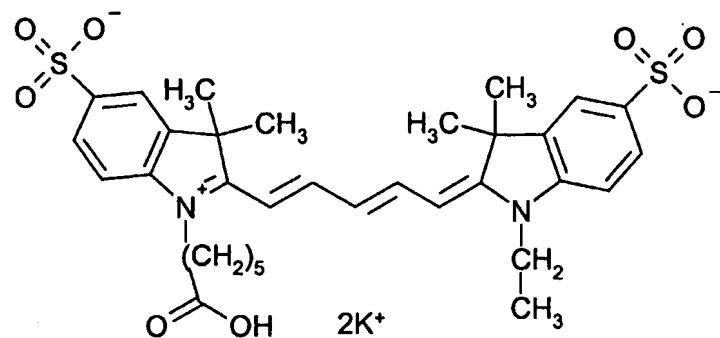
Die Farbstoffkonjugate der erfindungsgemäßen Farbstoffe zeigen geringere Aggregationsneigung als bisher übliche Polymethinfarbstoffe. Dies wird in Tabelle 2 deutlich.

20

**Tabelle 2**

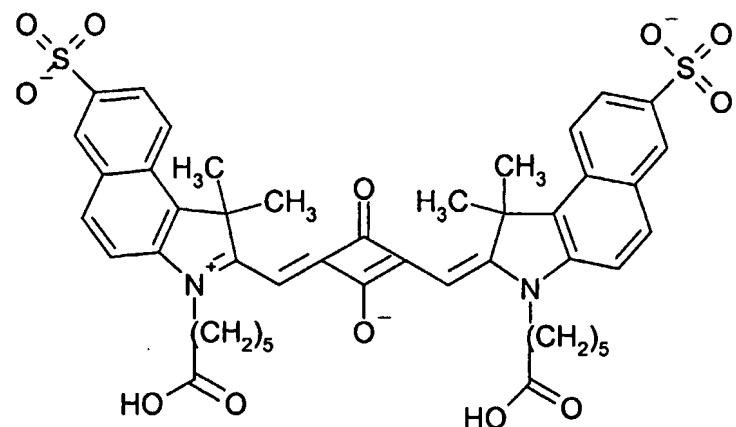
<b>Absorption Monomer/Absorption Dimer</b>			
	<b>Wasser</b>	<b>2,0 M NaCl</b>	<b>3,8 M NaCl</b>
CY5	3,12	3,18	3,19
Sq-3	2,98	2,14	1,78
Sq-1	4,65	4,48	3,40
Sq-2	2,96	2,98	1,36
F	2,89	2,81	2,81
J	4,40	4,35	4,40

- 89 -

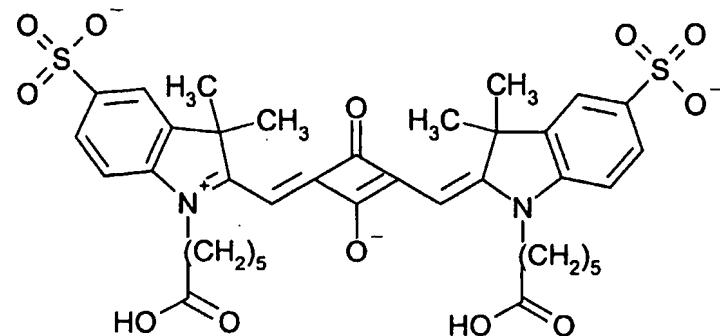


CY5

5

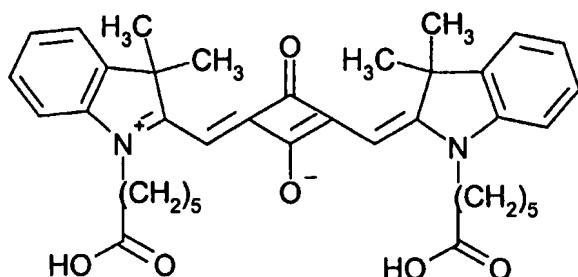


Sq-1



10

Sq-2



Sq-3

5 Die Intensität der Absorption im Absorptionsmaximum des Monomers ist ein relatives Maß für die Konzentration des Monomers in der Lösung. gleiches gilt für die Konzentration des Aggregates. diese kann mit der Intensität der Absorption im Absorptionsmaximum des Aggregates, welches hypsochrom gegenüber dem Monomer verschoben ist, korreliert werden.

10

Tabelle 2 zeigt das Verhältnis der Intensitäten der Absorptionsmaxima des Monomers und Aggregates. Die steigende Salzkonzentration bewirkt eine Zunahme der Aggregatbildung. Der erfindungsgemäße Farbstoff J zeigt gegenüber CY5 eine deutlich geringere Aggregatbildung. Quadratsäurefarbstoffe wie Sq-1 bis Sq-3 haben 15 keine stabile eigenschaften hinsichtlich der Aggregatsbildung. diese nimmt mit steigender Salzkonzentration zu.

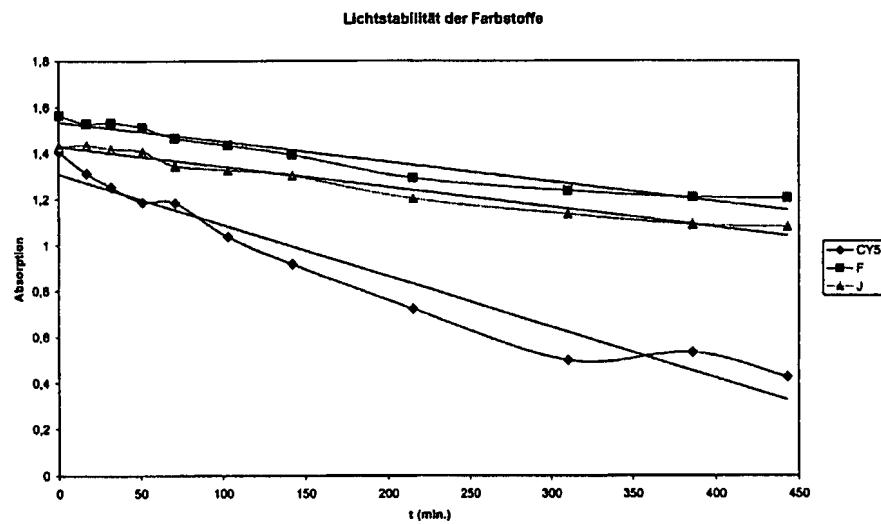
Die erfindungsgemäßen Farbstoffe F und J zeigen dagegen stabile Eigenschaften.

20 Lichtstabilität

Die Lichtstabilität wurde bestimmt, indem Farbstofflösungen dem Tageslicht ausgesetzt wurden. die Absorption der Lösungen variierte zwischen 1,4 und 1,6 O.D. Die Abnahme der Absorption im Laufe der Zeit ist ein Maß für die Lichtstabilität der Farbstoffe. Es wurden diese Bedingungen gewählt, weil auch das Handling der Farbstoffe manuelle Arbeitsschritte beinhaltet, die die Farbstoffe dem Tageslicht aussetzen. Bei CY5 ist deutlich erkennbar, dass sich bereits nach 30 min. Die Ab-

- 91 -

sorption um 12 % gefallen ist. Dies ist bei den erfindungsgemäßen Farbstoffen nicht der Fall, so dass diese auch benutzerfreundlicher sind, durch Erhalt einer stabilen Absorption.



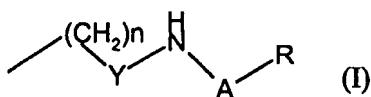
5

Patentansprüche

1. Polymethinfarbstoffe enthaltend mindestens einen Substituenten der Formel

(I)

5



worin

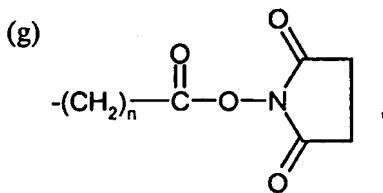
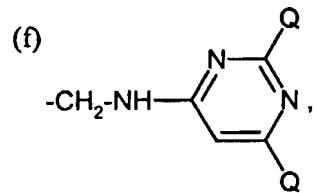
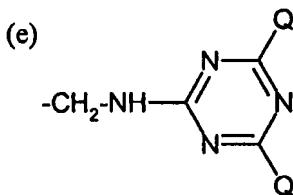
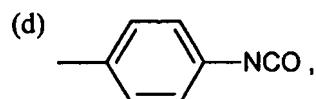
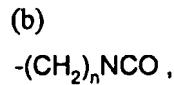
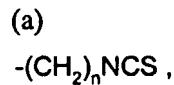
10 n für 1,2, 3, 4,5,6,7,8 oder 9 bedeuten

Y, A für elektronenziehende Reste, vorzugsweise C=O oder -SO2-, und

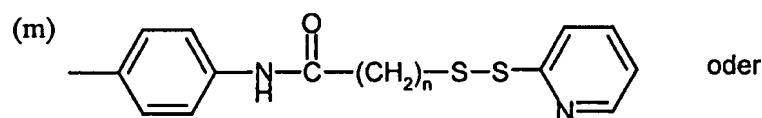
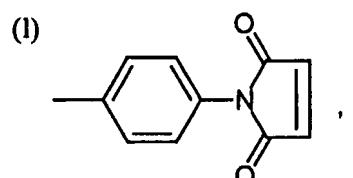
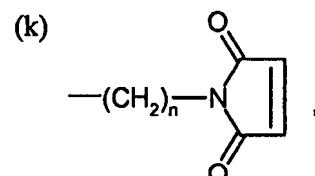
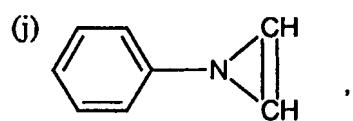
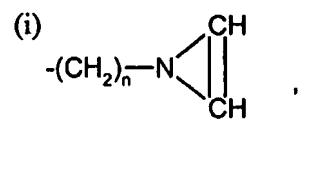
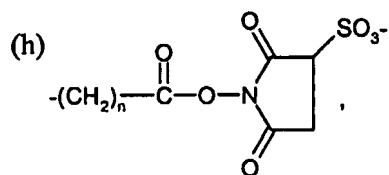
R für einen gegebenenfalls substituierten Alkyl- oder Arylrest stehen

15

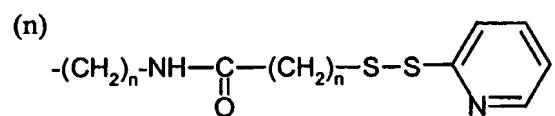
und mindestens einen Substituenten ausgewählt aus der Gruppe, die gebildet wird durch



- 93 -



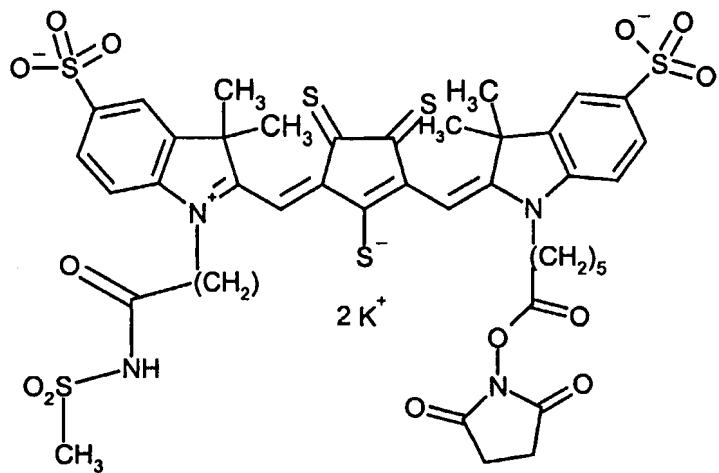
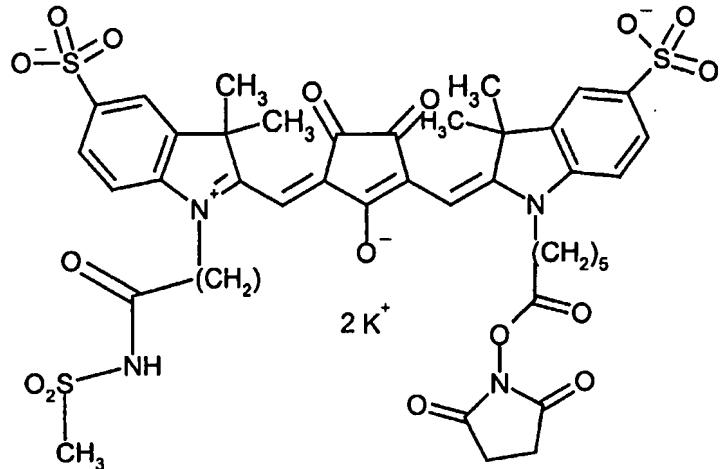
oder



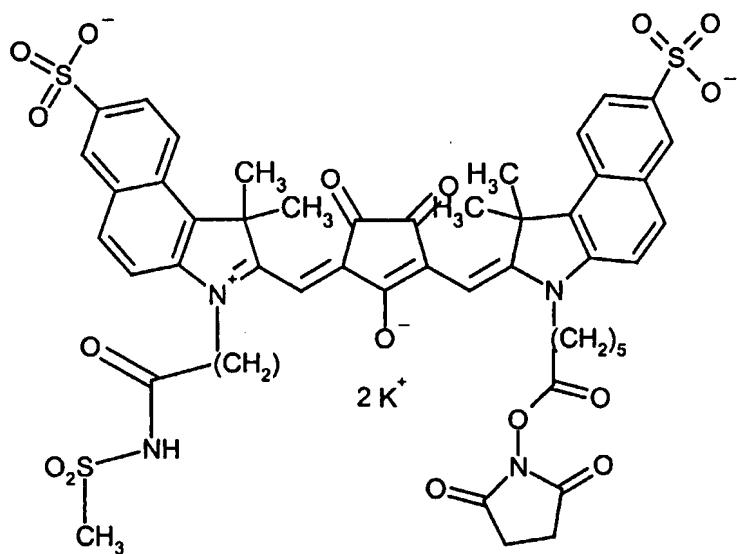
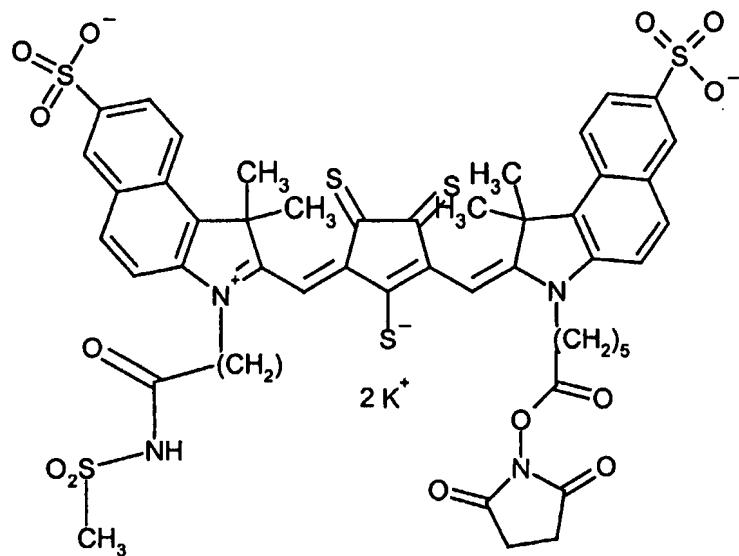
2. Verbindungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Polymethinfarbstoff um einen Cyaninfarbstoff, Merocyanin, Rhodacyanin, Styrolfarbstoff, Quadratsäurefarbstoff und/oder Crotonsäurefarbstoff handelt.
- 5
3. Verwendung von mindestens einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 oder 2 zum Markieren von Biomolekülen durch kovalente Bindung.
- 10
4. Verwendung von mindestens einem Polymethinfarbstoff enthaltend eine Gruppierung der Formel (I) zum Anfärben von Biomolekülen.

- 94 -

## 5. Verwendung von mindestens einer der folgenden Verbindungen

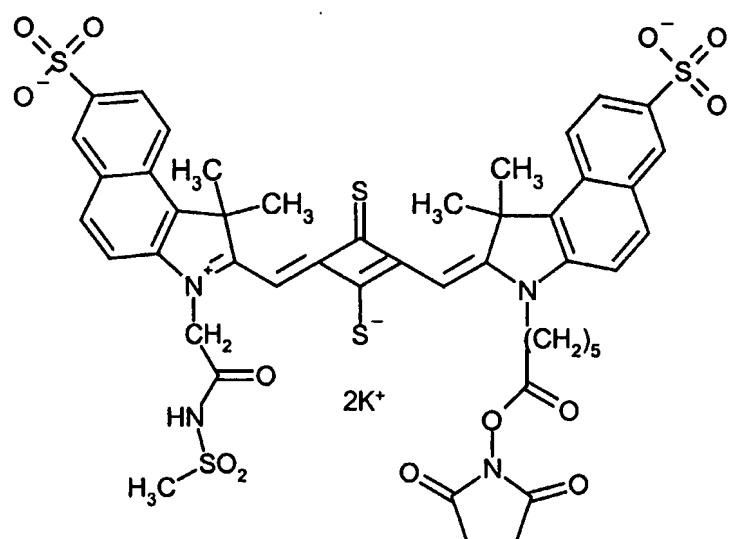
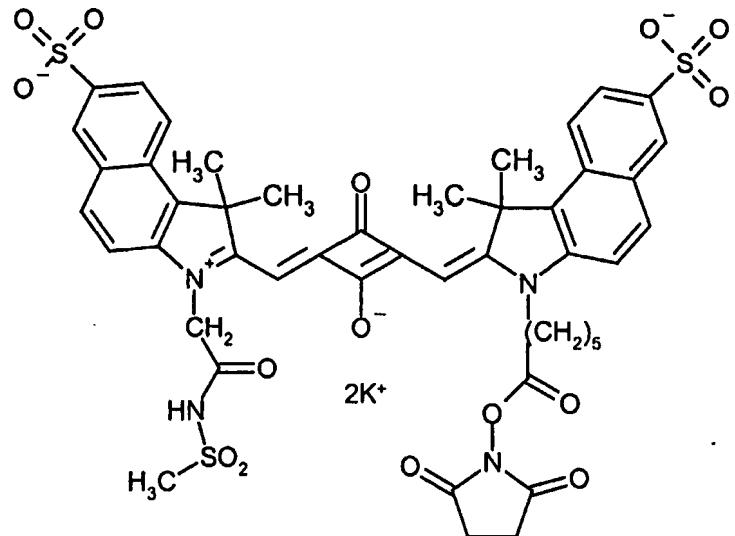


## Naphthole Croconium Dyes

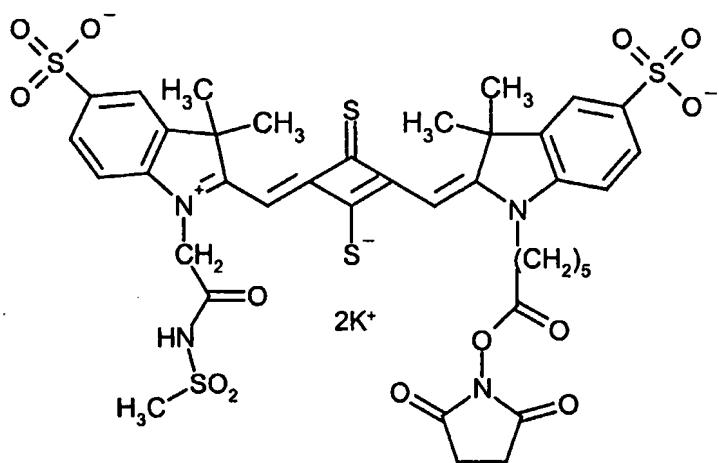
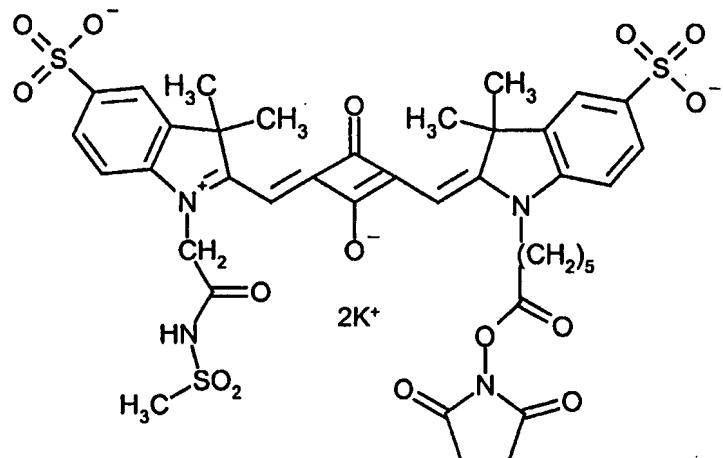


- 96 -

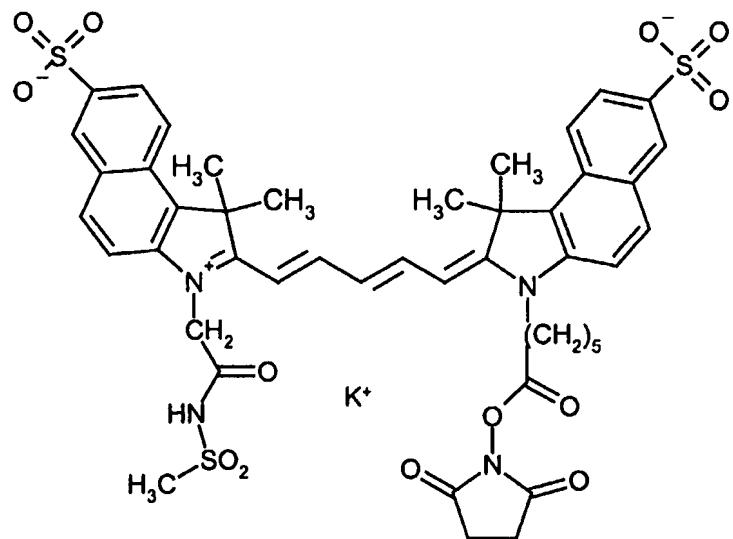
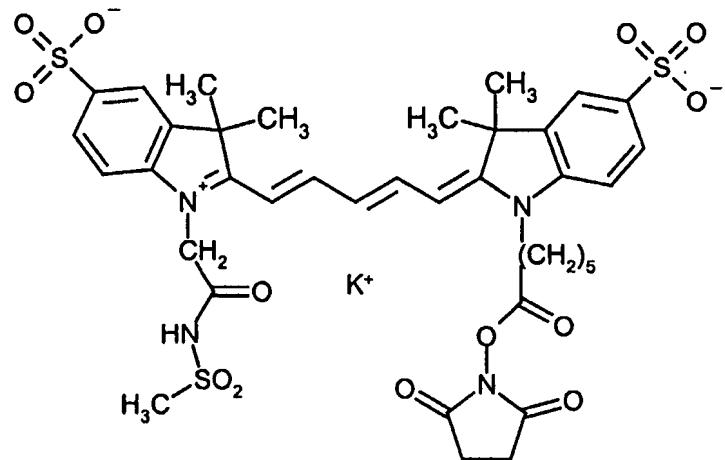
## Naphthole Squaraines



- 97 -



- 98 -



zum Markieren von Biomolekülen.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter Application No  
PCT/EP 00/07070

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 G01N33/58 G01N33/533 C09B23/14 C09B23/01

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 G01N C09B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99 31181 A (MUJUMDAR RATNAKAR B ;WAGGONER ALAN S (US); UNIV CARNEGIE MELLON (U) 24 June 1999 (1999-06-24) page 7, line 25 -page 11, line 11; examples ---	1-5
A	DE 39 12 046 A (UNIV CARNEGIE MELLON) 15 March 1990 (1990-03-15) page 9, line 22 -page 12, line 58; claim 1 & US 5 268 486 A 7 December 1993 (1993-12-07) cited in the application ---	1-3
A	WO 97 13810 A (SORIN BIOMEDICA CARDIO SPA ;DELLA CIANA LEOPOLDO (IT); GRIGNANI AN) 17 April 1997 (1997-04-17) cited in the application claim 12 ---	1-3
	-/-	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 January 2001

Date of mailing of the international search report

24-01-2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ketterer, M

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intel	I Application No
PCT/EP 00/07070	

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 10 81 311 B (GEVAERT PHOTO-PRODUCTEN N.V.) 5 May 1960 (1960-05-05) cited in the application the whole document ---	1,2
A	EP 0 779 540 A (AGFA GEVAERT NV) 18 June 1997 (1997-06-18) Formel (I) und alle weitere Formeln ---	1,2
A	EP 0 638 841 A (FUJI PHOTO FILM CO LTD) 15 February 1995 (1995-02-15) page 12 -page 17 ---	1,2
A	US 5 294 709 A (UKAI TOSHINO ET AL) 15 March 1994 (1994-03-15) Formeln: D-2, D-3, D-25, D-26, D-43, S-2, S-3, S-17, S-19, S-24, S-25 -----	1,2

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/EP00/07070****Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.: **1-4 (partially), 5 (completely)** because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
**See supplemental sheet ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210**
  
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**  
 The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/EP00/07070

Continuation of box I.2

Claims Nos.: 1-4 (partially), 5 (completely)

The present patent claims relate to a disproportionately large number of possible compounds.

They relate to such a large number of polymethine dyes and their corresponding constituents (substituents of formula (I) as well as formulae (a) to (n)) that they appear not to be sufficiently clear (and/or to be worded in too broad terms) according to the terms of Article 6 PCT to such an extent that a meaningful search is impossible.

For this reason, the search was restricted to parts of the claims that seemed to be supported and disclosed according to the above mentioned terms, i.e. those parts that relate to European Patent Classification classes

C09B23/00D

C09B23/00R

C09B23/00S

C09B23/00B

C09B23/14

G01N33/58D (application classes)

G01N33/533 (application classes)

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). EPO policy, when acting as an International Preliminary Examining Authority, is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case, irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report (Article 19 PCT) or during any Chapter II procedure whereby the applicant provides new claims.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 00/07070

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 9931181	A	24-06-1999	AU EP	1828899 A 1042407 A	05-07-1999 11-10-2000
DE 3912046	A	15-03-1990	JP	2191674 A 2757965 B 10096727 A 2898264 B 10088012 A US US US US	27-07-1990 25-05-1998 14-04-1998 31-05-1999 07-04-1998 23-01-1996 29-10-1996 29-10-1996 07-12-1993
WO 9713810	A	17-04-1997	IT AU AU CA EP US	MI952049 A 706668 B 7288296 A 2234450 A 0876428 A 6136612 A	09-04-1997 17-06-1999 30-04-1997 17-04-1997 11-11-1998 24-10-2000
DE 1081311	B		BE FR GB US	569130 A 1223289 A 904332 A 3282933 A	01-11-1966
EP 0779540	A	18-06-1997	JP US US	9179236 A 5936086 A 5741632 A	11-07-1997 10-08-1999 21-04-1998
EP 0638841	A	15-02-1995	DE DE JP US	69424006 D 69424006 T 7056265 A 5464734 A	25-05-2000 14-09-2000 03-03-1995 07-11-1995
US 5294709	A	15-03-1994	JP JP JP JP	2225476 A 2588773 B 2227466 A 2529884 B	07-09-1990 12-03-1997 10-09-1990 04-09-1996

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Interr des Aktenzeichen  
PCT/EP 00/07070

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 G01N33/58 G01N33/533 C09B23/14 C09B23/01

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 G01N C09B

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 99 31181 A (MUJUMDAR RATNAKAR B ; WAGGONER ALAN S (US); UNIV CARNEGIE MELLON (U) 24. Juni 1999 (1999-06-24) Seite 7, Zeile 25 -Seite 11, Zeile 11; Beispiele ---	1-5
A	DE 39 12 046 A (UNIV CARNEGIE MELLON) 15. März 1990 (1990-03-15) Seite 9, Zeile 22 -Seite 12, Zeile 58; Anspruch 1 & US 5 268 486 A 7. Dezember 1993 (1993-12-07) in der Anmeldung erwähnt ---	1-3



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- \*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- \*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- \*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- \*&\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
3. Januar 2001	24-01-2001
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter  Ketterer, M

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter	es Aktenzeichen
PCT/EP 00/07070	

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 97 13810 A (SORIN BIOMEDICA CARDIO SPA ;DELLA CIANA LEOPOLDO (IT); GRIGNANI AN) 17. April 1997 (1997-04-17) in der Anmeldung erwähnt Anspruch 12 ---	1-3
A	DE 10 81 311 B (GEVAERT PHOTO-PRODUCTEN N. V.) 5. Mai 1960 (1960-05-05) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1,2
A	EP 0 779 540 A (AGFA GEVAERT NV) 18. Juni 1997 (1997-06-18) Formel (I) und alle weitere Formeln ---	1,2
A	EP 0 638 841 A (FUJI PHOTO FILM CO LTD) 15. Februar 1995 (1995-02-15) Seite 12 -Seite 17 ---	1,2
A	US 5 294 709 A (UKAI TOSHINO ET AL) 15. März 1994 (1994-03-15) Formeln: D-2, D-3, D-25, D-26, D-43, S-2, S-3, S-17, S-19, S-24, S-25 -----	1,2

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 00/07070**Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1.  Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2.  Ansprüche Nr. 1–4 (teilweise), 5 (vollständig)  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
**siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210**
3.  Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

**Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)**

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese Internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2.  Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

**Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs**

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.  
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

## Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 1-4 (teilweise), 5 (vollständig)

Alle geltenden Patentansprüche beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Verbindungen.

In der Tat umfassen sie so viele Polymethinfarbstoffe mit entsprechender Substituierung (Substituenten der Formel (I) einerseits sowie der Formeln (a) bis (n) andereseits), daß sie im Sinne von Art. 6 PCT in einem solchen Maße unklar (und/oder zu weitläufig gefasst) erscheinen, daß eine sinnvolle Recherche undurchführbar ist.

Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als gestützt und offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend, die die Europäischen Patentklassen

C09B23/00D

C09B23/00R

C09B23/00S

C09B23/00B

C09B23/14

G01N33/58D (Applikationsklassen)

G01N33/533 (Applikationsklassen)

umfassen.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt.

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen die zur selben Patentfamilie gehören

Inten	es Aktenzeichen
PCT/EP 00/07070	

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9931181	A	24-06-1999	AU EP	1828899 A 1042407 A	05-07-1999 11-10-2000
DE 3912046	A	15-03-1990	JP JP JP JP JP US US US US	2191674 A 2757965 B 10096727 A 2898264 B 10088012 A 5486616 A 5569766 A 5569587 A 5268486 A	27-07-1990 25-05-1998 14-04-1998 31-05-1999 07-04-1998 23-01-1996 29-10-1996 29-10-1996 07-12-1993
WO 9713810	A	17-04-1997	IT AU AU CA EP US	MI952049 A 706668 B 7288296 A 2234450 A 0876428 A 6136612 A	09-04-1997 17-06-1999 30-04-1997 17-04-1997 11-11-1998 24-10-2000
DE 1081311	B		BE FR GB US	569130 A 1223289 A 904332 A 3282933 A	01-11-1966
EP 0779540	A	18-06-1997	JP US US	9179236 A 5936086 A 5741632 A	11-07-1997 10-08-1999 21-04-1998
EP 0638841	A	15-02-1995	DE DE JP US	69424006 D 69424006 T 7056265 A 5464734 A	25-05-2000 14-09-2000 03-03-1995 07-11-1995
US 5294709	A	15-03-1994	JP JP JP JP	2225476 A 2588773 B 2227466 A 2529884 B	07-09-1990 12-03-1997 10-09-1990 04-09-1996